## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## FACULDADE DE CIÊCNIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Sistemas líquido-cristalinos de monoleína e água para veiculação de antimicrobianos com aplicabilidade bucal

Carla Souza

### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

#### FACULDADE DE CIÊCNIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

# Sistemas líquido-cristalinos de monoleína e água para veiculação de antimicrobianos com aplicabilidade bucal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

**Área de Concentração**: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Carla Souza

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilisa

Guimarães Lara

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação de Ciências Farmacêuticas em 28/04/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

#### Souza, Carla

Sistemas líquido-cristalinos de monoleína e água para veiculação de antimicrobianos com aplicabilidade bucal. Ribeirão Preto, 2013.

107 p.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Lara, Marilisa Guimarães

- 1. Cristais líquidos. 2. Monoleína. 3. Sistemas de liberação de fármacos.
- 4. Mucoadesão. 5. Antimicrobianos.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Sistemas líquido-cristalinos de monoleína e água para veiculação de antimicrobianos com aplicabilidade bucal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

**Área de Concentração**: Medicamentos e Cosméticos

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilisa Guimarães Lara

Aprovada em:

#### Banca Examinadora

Prof. Dr.		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

#### **AGRADECIMENTOS**

À Deus.

Aos meus pais, Carlos e Noeme, que nunca mediram esforços em me oferecer segurança, apoio e carinho, e a todo empenho em me garantir a melhor educação, tanto acadêmica como moral. Não há como expressar toda minha felicidade e orgulho em dedicar este trabalho a vocês, como forma de agradecimento a todo o amor dado. Agradeço às minhas queridas irmãs, Emiliana e Mariana, com quem posso contar com toda confiança, apoio e amizade. Ao meu cunhado, Cláudio, pela amizade e carinho de sempre. E à Maxwel por ser meu grande companheiro e por todo seu amor.

À Prof.ª Dr.ª Marilisa Guimarães Lara, pela oportunidade de aprendizado e de crescimento profissional. Obrigada por toda sabedoria transmitida, confiança, paciência, dedicação, e por ter tornado meu sonho realidade.

Ao professor Dr. Evandro Watanabe pelo apoio, pela parceria em todas as análises microbiológicas, cuja ajuda foi de grande importância na análise e interpretação dos resultados, e principalmente pelo carinho e amizade de sempre.

Aos professores, Dr. Vinícius Pedrazi e Dr.ª Andréa Cândido dos Reis, Dr. Osvaldo de Freitas, Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas e Dr.ª Maria Vitória Lopes Badra Bentley, pela disponibilidade de utilização de equipamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À professora Dr.ª Márcia Carvalho de Abreu Fantini, que além da disponibilidade de equipamentos, prestou grande ajuda nas análises e interpretação dos resultados.

À Lívia Borgueti pela disponibilidade e ajuda nas análises de Difração de raios a baixos ângulos.

Aos técnicos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Henrique e José Orestes e ao Edson, técnico do Laboratório Interno de Pesquisa em Biocompatibilidade de Materiais, a quem agradeço pela ajuda na execução de medidas experimentais. E agradeço especialmente à Lariane, técnica do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pela dedicação, amizade e disponibilidade para ajudar sempre.

Às minhas amigas do programa de pós-graduação: Soninha, Juliana Maria, Juliana Vescovi e Luciana, pela amizade e momentos de alegria. E ao meu grande amigo, Renê, que além da amizade e carinho, muitas vezes dedicou seu tempo para me ajudar na análise dos resultados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, aos funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP-USP e à CAPES, pelo suporte financeiro concedido.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!



#### **RESUMO**

SOUZA, C. Sistemas líquido-cristalinos de monoleína e água para veiculação de antimicrobianos com aplicabilidade bucal. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Cristais líquidos são sistemas que se apresentam em um estado intermediário entre o estado sólido e líquido. A monoleína é um lipídio polar com capacidade de formar diferentes tipos de cristais líquidos liotrópicos na presença de água, caracterizados como fase lamelar, cúbica e hexagonal. Devido à capacidade de dos fármacos incorporados e às controlar a liberação propriedades mucoadesivas, estes sistemas são considerados potenciais veículos para a liberação controlada de fármacos na mucosa bucal. Sabendo que o desenvolvimento da cárie e doença periodontal está relacionado com a formação do biofilme, é necessário seu controle e prevenção para manutenção da saúde bucal. Dentre os agentes químicos disponíveis para prevenir e/ou diminuir a formação do biofilme, cloreto de cetilpiridínio (CCP), polihexametileno biguanida (PHMB) e Triclosan<sup>®</sup> têm sido amplamente utilizados. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar sistemas líquido-cristalinos de fase lamelar e cúbica formados por monoleína e água contendo antimicrobianos com aplicabilidade bucal. Os sistemas foram desenvolvidos usando monoleína e água e os antimicrobianos avaliados foram o CCP, o PHMB e o Triclosan<sup>®</sup>. A formação das fases líquido-cristalinas com e sem a presença de cada fármaco estudado foi identificada por microscopia de luz polarizada. Além disso, foi avaliado o intumescimento dos sistemas contendo os fármacos estudados após contato com saliva artificial; a atividade antimicrobiana e o perfil de liberação in vitro, bem como o tempo de permanência e a força de mucoadesão ex vivo em mucosa de bochecha de porco. Foi possível obter os sistemas líquido-cristalinos para os fármacos avaliados, e o intumescimento de todos os sistemas foi caracterizado como cinética de segunda ordem. Os resultados do perfil de liberação e da atividade antimicrobiana *in vitro* para PHMB e Triclosan<sup>®</sup> foram favoráveis para aplicação bucal, no entanto, o CCP não é adequado para veiculação neste sistema. O perfil de liberação dos fármacos à partir desses sistemas foi influenciado pelas propriedades físico-químicas e concentração dos fármacos, bem como pelo intumescimento. Ainda, a fase lamelar apresentou maior tempo de permanência que a fase cúbica e a força de mucoadesão média da fase lamelar foi de 1,02 ± 0,50 N e da fase cúbica foi de 0,45 ± 0,10 N. Logo, os sistemas líquido-cristalinos de monoleína e água são um interessante veículo com potencial para liberação controlada dos antimicrobianos PHMB e Triclosan<sup>®</sup> na mucosa bucal com o objetivo de otimizar a eficácia destes fármacos.

**Palavras-chave:** cristais líquidos, monoleína, sistemas de liberação de fármacos, administração bucal, mucoadesão, antimicrobianos.

#### **ABSTRACT**

SOUZA, C.. Liquid crystalline systems formed by monoolein and water with antimicrobial agents to buccal release. 2013. 107 f. Dissertation (Master). Pharmaceutical Sciences School of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Liquid crystals are systems which are in an intermediate state between solids and liquids. Monoolein is a polar lipid capable of forming different types of lyotropic liquid crystals in aqueous environment, which can be classified into lamellar, cubic and hexagonal mesophases. Due to its ability to control drug release and its mucoadhesive properties, these systems have been considerated as potential vehicle to control drug release on buccal mucosa. Based on the knowledge that the development of caries and periodontal disease is related to the biofilm formation, it is necessary their control and prevention to maintain the buccal health. Among the available chemical agents to prevent and/or reduce biofilm formation, cetylpyridinium chloride (CPC), polyhexamethylene biguanide (PHMB) and Triclosan® have been widely used. Based on these facts, the objective of this study was to develop and characterize liquid-crystalline systems formed by monoolein and water, containing antimicrobial agents with buccal applicability. The systems were developed using monoolein and water, and the antimicrobial agents evaluated were CCP, PHMB and Triclosan®. The liquid-crystalline phases with and without the presence of each drug was identified by polarized light microscopy. Furthermore, it was evaluated the swelling of the systems containing the drugs studied after contact with artificial saliva; the in vitro antimicrobial activity and its release profile, as well as the residence time and ex vivo mucoadhesion strength on pig cheek mucosa. It was possible to obtain liquid-crystalline phases for all drugs, and the swelling of all systems was characterized according to secondorder kinetics. The results of release profile and antimicrobial activity in vitro to PHMB and Triclosan® were favorable for buccal application, however CCP is not suitable to be released from these systems. The drug release profile from these systems was influenced by the physicochemical properties and loading of the drugs, as well as by swelling. Furthermore, the lamellar phase showed greater residence time that the cubic phase and the mucoadhesion strength average of lamellar phase was  $1.02 \pm 0.50$  N and for cubic phase was  $0.45 \pm 0.10$  N. Thus, the liquid crystalline systems forming by monoolein and water are an interesting vehicle with potential to control release of the PHMB and Triclosan® on the buccal mucosa in order to optimize the drug effectiveness.

**Keywords:** liquid crystals, monoolein, drug release systems, buccal administration, mucoadhesion, antimicrobials.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1:	Estrutura das fases líquido-cristalinas: A) Fase lamelar, B) Fase cúbica
	e C) Fase hexagonal3
Figura 2: l	Estrutura da monoleína4
_	Localização do fármaco no sistema líquido-cristalino de acordo com suas propriedades físico-químicas5
_	Diagrama esquemático da conformação molecular da monoleína e estruturas auto-organizacionais formadas com seus correspondentes valores de parâmetro de empacotamento ( <i>P</i> )6
Figura 5: <sup>-</sup>	Teoria de desidratação da membrana durante mucoadesão10
_	Representação das forças que podem ser medidas em testes de mucoadesão10
_	Esquema da curva de força (N) <i>versus</i> deformação do sistema (mm) e dados obtidos a partir da mesma11
Figura 8:	Diagrama da sessão transversal da mucosa bucal14
_	Representação da metodologia para avaliação do tempo de permanência <i>ex vivo</i> em mucosa de bochecha de porco para FL e FC.
Figura 10	Equipamento utilizado para determinação da força de destacamento ex vivo para os sistemas líquido-cristalinos: A) Máquina universal de ensaios e B) Suportes de acrílico com mucosa de bochecha de porco.

Figura 1	11:	Fotomicrografias de A) FL e B) FC sem adição dos fármacos após 24
		horas de repouso41
Figura 1	12:	Fotomicrografias de FL com A) PHMB 0,2%; B) PHMB 2,0%; C) PHMB 5,0%; D) CCP 0,05%; E) CCP 2,5% e F) CCP 5,0% após 24 horas de repouso41
Figura	13:	Fotomicrografias dos sistemas líquido-cristalinos formadas após adição do Triclosan <sup>®</sup> : A) FL com 0,3%; B) FH com 2,0% e C) FH com 5,0%, após 24 horas de repouso42
Figura 1	14:	Fotomicrografias de FL de A) CCP 5,0% e B) PHMB 5% após 7 dias de repouso42
Figura 1	15:	Difratogramas de raios X dos sistemas líquido-cristalinos de MO e água (90/10) com e sem a adição de 2,0% (p/p) de PHMB, linhas preta e vermelha, respectivamente
Figura 1	16:	Perfil de intumescimento pelo método de hidratação por contato em esponja para os sistemas com e sem fármaco para A) FL e B) FC 48
Figura 1	17:	Perfil de intumescimento pelo método de imersão para os sistemas com e sem fármaco para A) FL e B) FC49
Figura 1	18:	Perfil de intumescimento pelo método de hidratação por contato em esponja para os sistemas com diferentes concentrações de PHMB A) FL (razão 10/90 de água/MO) e B) FC (razão 30/70 de água/MO) 51
Figura 1	19:	Perfil de intumescimento pelo método de hidratação por contato em esponja para os sistemas com diferentes concentrações de Triclosan <sup>®</sup> com teor inicial de água de A) 10% e B) 30%

Figura 20:	Intumescimento segundo cinética de 2ª ordem para os sistemas
	líquido-cristalinos pelo método de hidratação por contato em esponja:
	A) FL e B) FC, com e sem adição dos fármacos (SHOTT, 1992) 54
Figura 21:	Intumescimento segundo cinética de 2ª ordem para os sistemas
	líquido-cristalinos pelo método de imersão: A) FL e B) FC com e sem
	adição dos fármacos (SHOTT, 1992)54
Figura 22:	Média do diâmetro dos halos de inibição (mm) ± desvio padrão para os
	sitemas líquido-cristalinos e solução aquosa em função da
	concentração de PHMB e micro-organismos, (n=2)60
Figura 23:	Esquema do efeito promotor de absorção do ácido oléico nas
	bicamadas lipídicas do estrato córneo: A) Bicamada lipídica intacta; B)
	Bicamada lipídica após introdução do ácido oléico61
Figura 24:	Média do diâmetro dos halos de inibição (mm) ± desvio padrão para os
	sistemas líquido-cristalinos de FC (40/60) e solução alcoólica em
	função da concentração de Triclosan <sup>®</sup> e micro-organismos, (n=2) 64
Figura 25:	Curva padrão média do CCP em solução tampão fosfato isotônico p
	7,466
Figura 26:	Curva padrão média do Triclosan <sup>®</sup> em solução tampão fosfato pH 7,4
	contendo Tween 20 a 2% (p/v)67
Figura 27:	Curva padrão média do PHMB em solução tampão fosfato isotônico
	pH 7,468
Figura 28:	Perfil de liberação de sistema líquido-cristalino de FL contendo CCP
	na concentração de 2,5% e 5,0% (p/p) usando membrana de acetato
	de celulose e tampão fosfato isotônico pH 7,4 como solução
	receptora. (n=3)

Figura 29:	Absorção do CCP em MO à partir de uma solução em tampão fosfato isotônico pH 7,4 e tampão de HCl 0,2M pH 1,273
Figura 30:	Perfil de liberação <i>in vitro</i> para sistema líquido-cristalino de A) FL e B) FC contendo PHMB em diferentes concentrações e para solução aquosa contendo 2,0% (p/p) de PHMB usando tampão fosfato pH 7,4 como solução receptora
Figura 31:	Perfil de liberação <i>in vitro</i> para os sistemas líquido-cristalinos de FL, FC e FH contendo Triclosan <sup>®</sup> em diferentes concentrações em tampão fosfato isotônico pH 7,4 com adição de 2,0% (v/v) de Tween 20
Figura 32:	Cinética de liberação para FL e FC contendo diferentes concentrações de PHMB segundo A) Cinética de Ordem Zero; B) Modelo de Higuchi e C) Cinética de 1ª Ordem
Figura 33	: Avaliação da cinética de liberação para FL contendo PHMB na concentração de 0,2% (A e B), 2,0% (C e D) e 5,0% (E e F) segundo modelo proposto por Schwartz (1968) para Cinética de Primeira Ordem* e Modelo de Higuchi**
Figura 34	: Avaliação da cinética de liberação para FC contendo PHMB na concentração de 0,2% (A e B), 2,0% (C e D) e 5,0% (E e F) segundo modelo proposto por Schwartz (1968) para Cinética de Primeira Ordem* e Modelo de Higuchi**83
Figura 35:	Determinação do expoente difusional (Rigter & Pepas, 1987) para o perfil de liberação dos sistemas de FL (1ª coluna) e FC (2ª coluna) contendo PHMB nas concentrações de 0,2% (A e D), 2,0% (B e E) e 5,0% (C e F)

Figura 36:	Cinética de liberação para sistemas líquido-cristalinos contendo
	Triclosan® em diferentes concentrações segundo A) Cinética de
	Ordem Zero; B) Modelo de Higuchi e C) Cinética de 1ª Ordem86
Figura 37:	Relação entre a média da força máxima de destacamento (N) ± desvio
	padrão e o conteúdo inicial de água dos sistemas líquido-cristalinos
	de MO/água determinadas em mucosa de bochecha de porco (n=5).
	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela I: Compo	sição química da saliva artificial2
cristali	s obtidos através da análise por SAXS dos sistemas líquido nos de MO/água (90/10) com e sem adição de 2,0% de PHME
2 <sup>a</sup> ord	s dos coeficientes de correlação linear segundo modelos de 1ª lem (SCHOTT, 1992) para os sistemas líquido-cristalino dos pelo método de hidratação por contato em esponja5
2 <sup>a</sup> or	es dos coeficientes de correlação linear segundo modelos de 1ª lem (SCHOTT, 1992) para os sistemas líquido-cristalino dos pelo método imerso5
intume	es de capacidade máxima (g/g) e velocidade inicial (h.g/g) de scimento para os sistemas líquido-cristalinos estudados segundo de cinética de intumescimento de 2ª ordem5
avaliaç	ia dos halos de inibição (mm) ± desvio padrão obtidos r ão da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de uma solução o dina na concentração de 0,12% (p/p) - controle positivo5
obtido: conter	a dos diâmetros dos halos de inibição (mm) ± desvio padrã s na avaliação da atividade antimicrobiana dos sistema do CCP em diferentes concentrações à partir da FC e d o aquosa5
para c	lia dos diâmetros dos halos de inibição (mm) ± desvio padrã s sistemas líquido-cristalinos de FC (40/60) e solução aquos do PHMB em diferentes concentrações5

Tabela IX: Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) ± desvio padrão para
os sistemas líquido-cristalinos de FC, FH (40/60) e solução alcoólica
40,0% (v/v) contendo Triclosan® em diferentes concentrações 63
Tabela X: Média dos valores de absorbância obtidos para cada concentração e
desvio padrão da curva padrão média de CCP em tampão fosfato pH
7,466
Tabela XI: Resultados obtidos nos parâmetros precisão e exatidão para o CCP.66
Tabela XII: Média dos valores de absorbância obtidos para cada concentração e
desvio padrão da curva padrão média de Triclosan <sup>®</sup> em tampão fosfato
isotônico pH 7,4 com adição de 2,0% (p/p) de Tween 20 67
Tabela XIII: Resultados obtidos nos parâmetros precisão e exatidão para o
Triclosan <sup>®</sup> 68
Tabela XIV: Resultados obtidos nos parâmetros precisão e exatidão para o
PHMB69
Tabela XV: Quantidade de fármaco liberado (mg) ± desvio padrão de sistema
líquido-cristalino de FL contendo CCP em diferentes concentrações
usando membrana de acetato de celulose e tampão fosfato isotônico
pH 7,4 como solução receptora (n=3)70
Tabela XVI: Quantidade de fármaco liberado (mg) à partir de uma solução aquosa
contendo 5,0% (p/p) de CCP em tampão fosfato isotônico pH 7,4
usando diferentes membranas71
Tabela XVII: Quantidade de CCP absorvido em MO à partir de uma solução em
tampão fosfato isotônico pH 7.4 e tampão de HCL 0.2M pH 1.2 73

Tabela XVII	II: Quantidade de fármaco liberado (mg) ± desvio padrão para os
	sistema líquido-cristalino de MO/água de FL contendo PHMB em
	diferentes concentrações e da solução aquosa à 2,0% (p/p), usando
	tampão fosfato pH 7,4 como solução receptora74
Tabela XIX	: Quantidade de fármaco liberado (mg) ± desvio padrão para os sistema líquido-cristalino de MO/água de FC contendo PHMB em
	diferentes concentrações e da solução aquosa à 2,0% (p/p), usando tampão fosfato pH 7,4 como solução receptora75
Tabela XX:	Quantidade de fármaco liberado (mg) ± desvio padrão à partir de sistema líquido-cristalino contendo Triclosan® em diferentes concentrações, usando tampão fosfato pH 7,4 com 2,0% (v/v) de Tween 20 como solução receptora
Tabela XXI:	Coeficientes de correlação linear (R²) segundo vários modelos para a liberação de PHMB à partir dos sistemas líquido-cristalinos81
Tabela XXII	: Coeficientes de correlação linear (R²) segundo Schwarts (1968) para a liberação de PHMB à partir de sistema líquido-cristalino82
Tabela XXI	II: Expoente difusional (Rigter & Pepas, 1987) para o perfil de liberação dos sistemas de MO/água contendo PHMB em diferentes concentrações84
Tabela XXI\	/: Coeficientes de correlação linear (R²) segundo vários modelos para os sistemas líquido-cristalinos contendo Triclosan® em diferentes concentrações
Tabela XX\	/: Média da força máxima de destacamento (F <sub>máx</sub> ) e trabalho de adesão (T <sub>adesão</sub> ) para os sistemas líquido-cristalinos de FC e FL com e sem a presenca do PHMB e FH contendo Triclosan <sup>®</sup>

#### LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A<sub>int</sub> Área limite interna específica

AO Ácido oléico

Ca Capacidade de intumescimento

Ca<sub>máx</sub> Capacidade máxima de intumescimento

CCP Cloreto de cetilpiridínio

CL Cristal líquido

CLL Cristal líquido liotrópico

DPR Desvio padrão relativo

FC Fase cúbica
FL Fase lamelar

FH Fase hexagonal

F<sub>máx</sub> Força máxima de destacamento

MO Monoleína

MRSA Staphilococcus aureus resistente à meticilina

ND Não determinado

NR Não realizado

PHMB Polihexametileno biguanida

SAXS Difração de raios a baixo ângulo

T<sub>adesão</sub> Trabalho de adesão

V<sub>i</sub> Velocidade inicial de intumescimento

## SUMÁRIO

Resumo		I
Abstract	t	ii
Lista de	figuras	iii
Lista de	tabelas	viii
Lista de	abreviaturas e siglas	xi
1. INTI	RODUÇÃOCristais líquidos	1
1.2.	Mucoadesão	7
1.3.	Aplicação bucal de cristais líquidos	11
1.4.	Estrutura da mucosa bucal	13
1.5.	Microflora oral residente	16
2. OBJI	ETIVOS	20
3. MAT	TERIAL E MÉTODOS	22
3.1.	Material	23
3.2.	Métodos	23
3.2.1.	Desenvolvimento dos sistemas líquido-cristalinos contendo os antimicrob	ianos
estudado	os	
3.2.2.	Avaliação da formação das fases líquido-cristalinas	
3.2.2.1.	Microscopia de luz polarizada	24
3.2.2.2.	Análise por difração de raios a baixo ângulo (SAXS)	24
3.2.3.	Avaliação do intumescimento ("swelling")	25
3.2.4.	Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana	27
3.2.5.	Validação da metodologia de quantificação do PHMB, CCP e Triclosan®	28
3.2.5.1.	Linearidade	29
3.2.5.2.	Precisão	29
3.2.5.3.	Limite de Detecção	30
3.2.5.4.	Limite de Quantificação	30
3.2.5.5.	Exatidão	30
3.2.6.	Determinação da solubilidade dos fármacos estudados	31
3.2.7.	Avaliação do perfil de liberação in vitro dos fármacos estudados	31
3.2.7.1.	Condições do estudo do perfil de liberação in vitro	31
3.2.7.2.	Avaliação do perfil de liberação in vitro dos sistemas contendo CCP	32

3.2.7.2.1.	Estudo do perfil de liberação in vitro	32
3.2.7.2.2.	Avaliação da membrana utilizada no estudo de liberação in vitro	32
3.2.7.2.3.	Avaliação da interferência da MO no método de quantificação do CCP	32
3.2.7.2.4.	Estudo da absorção de CCP em MO	33
3.2.7.3.	Avaliação do perfil de liberação in vitro dos sistemas contendo PHMB	33
3.2.7.4.	Avaliação do perfil de liberação in vitro dos sistemas contendo Triclosan®	34
3.2.7.5.	Avaliação do mecanismo de liberação dos sistemas contendo PHMB	е
Triclosan <sup>®</sup>	B	34
3.2.8.	Avaliação in vitro das propriedades de mucoadesão em mucosa de bochec	ha
de porc	o	35
3.2.8.1.	Tratamento e obtenção da mucosa de bochecha de porco	35
3.2.8.2.	Avaliação do tempo de permanência ex vivo dos sistemas líquido-cristalin	os
em mucos	sa bucal	36
3.2.8.3.	Avaliação da força de mucoadesão ex vivo em mucosa bucal	36
3.2.9.	Análise dos resultados	38
<ol> <li>4. RESU</li> <li>4.1.</li> </ol>	ILTADOS E DISCUSSÃO	
	antimicrobianos com aplicabilidade bucal	
4.1.1.	Microscopia de luz polarizada	
4.1.2.	Análise de difração de raios a baixo ângulo (SAXS)	
4.2.	Avaliação do intumescimento ("swelling")	
4.2.1.	Efeito do teor inicial de água e da adição dos fármacos	
4.2.2.	Avaliação do efeito da concentração do PHMB	
4.2.3.	Avaliação do efeito da concentração do Triclosan <sup>®</sup>	
4.2.4.	Avaliação do efeito da concentração do CCP	
4.2.5.	Caracterização da cinética de intumescimento	
4.3.	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antibacteriana	
4.3.1.	Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> para os controles positivo e negativo	
4.3.2.	Atividade antibacteriana in vitro dos sistemas contendo CCP	
4.3.3.	Atividade antimicrobiana in vitro dos sistemas contendo PHMB	
4.3.4.	Atividade antimicrobiana in vitro dos sistemas contendo Triclosan®	
4.4.	Validação da metodologia de quantificação do CCP, Triclosan® e PHMB	
4.4.1.	Validação da metodologia de quantificação do CCP	
4.4.2.	Validação da metodologia de quantificação do Triclosan®	
4.4.3.	Validação da metodologia de quantificação do PHMB	

4.5.	Estudo do perfil de liberação in vitro dos fármacos estudados	69
4.5.1	. Avaliação do perfil de liberação in vitro dos sistemas contendo	CCP69
4.5.1	.1. Estudo do perfil de liberação in vitro	69
4.5.1	.2. Avaliação da membrana utilizada no estudo de liberação in vitro	o71
4.5.1	.3. Avaliação da interferência da MO no método de quantificação d	lo CCP71
4.5.1	.4. Estudo da absorção do CCP em MO	72
4.5.2	. Estudo do perfil de liberação in vitro dos sistemas contendo PH	MB74
4.5.3	. Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> do Triclosan <sup>®</sup>	78
4.5.4	. Mecanismo de liberação dos sistemas líquido-cristalinos	80
4.5.4	.1. Mecanismo de liberação dos sistemas contendo PHMB	80
4.5.4	.2. Mecanismo de liberação dos sistemas contendo Triclosan <sup>®</sup>	85
4.6.	Avaliação in vitro da mucoadesão em mucosa bucal	87
4.6.1	. Avaliação ex vivo do tempo de permanência em mucosa bucal.	87
4.6.2	. Avaliação ex vivo da força de mucoadesão	88
5. (	CONCLUSÕES	92
<b>6.</b> ]	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

## 1.INTRODUÇÃO1

<sup>1</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR10520 e NBR 14724:2011.

#### 1.1. Cristais líquidos

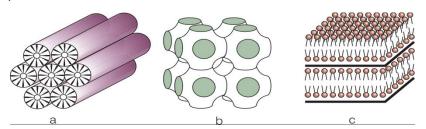
Cristais líquidos (LC) são sistemas que se apresentam num estado intermediário entre o estado sólido e líquido, também denominado estado mesomórfico (TYLE, 1989). LC's são classificados principalmente como termotrópicos e liotrópicos, dependendo dos parâmetros físico-químicos responsáveis pela transição de fases. Em sistemas termotrópicos a transição de fase é dependente da temperatura, e em sistemas liotrópicos é dependente da adição de solvente e da variação de temperatura (PATEL & PATEL, 2010). CL liotrópicos (LLC's) são formados por lipídeos polares em presença de um solvente, como a água, que hidrata a porção polar do lipídeo através de pontes de hidrogênio, enquanto as cadeias flexíveis do lipídeo se agregam em regiões hidrofóbicas fundidas, baseadas nas interações de van der Waals (LIBSTER et al., 2011).

Estes sistemas podem exibir uma rica variedade de polimorfismo em sua organização lipídica, podendo se auto-organizar em fases liotrópicas termodinamicamente estáveis como as fases lamelar, cúbica e hexagonal (Figura 1) (RIZWAN et al., 2009; GUO et al., 2010). A formação das mesofases depende de como as moléculas de lipídeo se organizam em determinadas condições de temperatura e hidratação. Entre os fatores que influenciam esta formação, podemos citar: propriedades do lipídeo (tamanho da cadeia carbônica, presença de insaturações, polaridade entre outros), grau de hidratação do sistema, temperatura e presença de solutos, os quais podem ser o fármaco propriamente dito ou co-solventes adicionados aos sistemas para obter a mesofase desejada (CLOGSTON et al., 2000; QIU & CAFFREY, 2000).

A fase lamelar constitui a forma de organização mais simples, sendo formada por bicamadas lipídicas empilhadas em uma conformação planar unidimensional separadas por canais de água. Os grupamentos polares do lipídeo se encontram adjacentes e projetados para a interface aquosa, enquanto as caudas hidrocarbonadas encontram-se dispostas paralelamente. Esta conformação é formada quando os canais de água interpenetram a cabeça dos

grupos polares do lipídeo (CABOI et al., 2001; SALLAM et al., 2002; LARA et al., 2005; SHAH et al., 2001).

**Figura 1:** Estrutura das fases líquido-cristalinas: A) Fase hexagonal, B) Fase cúbica e C) Fase lamelar.



Fonte: Adaptado de SEDDON, 1990; TATE et al., 1991; QIU & CAFFREY, 2000.

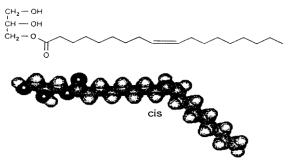
A fase cúbica consiste de uma estrutura tridimensional formada por duas redes de canais de água abertos e congruentes circundados por infinitas bicamadas lipídicas curvas (CABOI et al., 2001; LARA et al., 2005; SALLAM et al., 2002). Essa curvatura característica das bicamadas na fase cúbica está associada com duas energias livres: a energia de curvatura de cada monocamada *versus* a energia de estiramento das cadeias lipídicas. Essas duas energias atuam simultaneamente na fase cúbica e determinam a sua estabilidade termodinâmica e formação espontânea em função da sua composição, resultando na conformação característica desta fase (SHAH et al., 2001).

A fase hexagonal é formada por infinitos canais de água intimamente empacotados hexagonalmente e circundados por uma monocamada do lipídio (estrutura em favo de mel) (DRUMMOND & FONG, 2000). Na fase hexagonal normal as partes polares do lipídeo estão voltadas para a superfície do cilindro. Na fase hexagonal reversa são as cadeias apolares que estão voltadas para fora. Sua obtenção torna-se possível pela adição de substâncias apolares ao sistema (SHAH et al., 2001).

Diferentes classes de lipídeos, incluindo fosfolipídios, alquil gliceratos e glicolipídios têm sido investigados por sua habilidade em formar cristais líquidos, mas a maioria dos trabalhos foca no uso, principalmente, do monoleato de glicerila, ou monoleína, cuja estrutura está esquematizada na Figura 2 (RIZWAN et al., 2009). A monoleína (MO) é um monoglicerídeo insaturado de cadeia longa formado pela mistura de glicerídeos do ácido oléico e outros ácidos graxos. Além

disso, é um lipídeo polar, natural, atóxico e biodegradável, com capacidade de formar diferentes tipos de cristais líquidos liotrópicos na presença de água, que têm sido estudados como carreadores de fármacos para diferentes vias de administração, demonstrando capacidade de sustentar a liberação dos fármacos incorporados (ENGSTROM, 1990; LARA et. al., 2005).

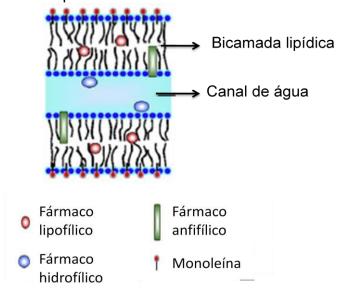
Figura 2: Estrutura da monoleína.



Fonte: CZESLIK, 1995.

Devido à estrutura complexa que apresentam, vários trabalhos reportam a capacidade desses sistemas de sustentar a liberação de fármacos incorporados, uma vez que a difusão do fármaco no sistema pode aumentar o tempo de liberação do mesmo, apresentando muitas vezes, cinética de liberação controlada por difusão (BURROWS et al., 1994; GERAGHTY et al, 1996; KUMAR et al., 2004; SHAH et al., 2001). Além disso, o uso desses sistemas de MO/água como sistemas de liberação de fármacos é interessante porque são capazes de incorporar moléculas de vários tamanhos e polaridades, incluindo proteínas e peptídeos (LARA et. al., 2005; PHAN et al., 2011). Fármacos hidrofílicos incorporados ficam localizados próximo à cabeça polar da MO ou nos canais de água, enquanto fármacos lipofílicos ficam localizados dentro da bicamada lipídica e fármacos anfifílicos ficam localizados na interface (Figura 3) (GUO et al., 2010).

**Figura 3:** Localização do fármaco no sistema líquido-cristalino de acordo com suas propriedades físico-químicas.



Fonte: Adaptado de Guo et al, 2010.

A polaridade e estrutura molecular do fármaco determinam se ele estará localizado na interface polar ou na região apolar da camada lipídica, afetando diferentemente o parâmetro de empacotamento do sistema (*P*) e a estrutura cristalina (CABOI et al., 2001). O parâmetro de empacotamento é utilizado para predizer qual a fase líquido-cristalina que será preferencialmente formada por um determinado lipídio, uma vez que relaciona a estrutura e propriedades moleculares com a curvatura favorecida na interface polar-apolar e, portanto, a conformação e estrutura do agregado formado (CABOI et al., 2001; RIZWAN et al., 2009). O parâmetro de empacotamento é dado pela seguinte equação:

$$P = \frac{\mathbf{0}}{al} \tag{1}$$

Onde:

P = parâmetro de empacotamento;

υ = volume da cadeia hidrofóbica do lipídio;

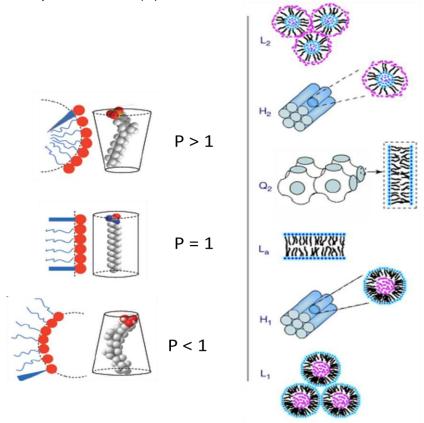
a = área da cabeça polar do lipídio;

l = comprimento da cadeia hidrofóbica do lipídio.

Dependendo do valor de P, diferentes estruturas auto-organizáveis podem ser formadas. Quando P = 1, a fase lamelar se forma; P < 1, as fases micelar

normal ou hexagonal normal se formam e quando P > 1, as fases cúbica, hexagonal reversa ou micelar reversa se formam, Figura 4 (GUO et al., 2010; FONG et al., 2012).

**Figura 4:** Diagrama esquemático da conformação molecular da monoleína e estruturas auto-organizacionais formadas, com seus correspondentes valores do parâmetro de empacotamento (*P*).



Fonte: Adaptado de Fong et al., 2012; Guo et al., 2010.

O valor de *P* pode ser alterado pela adição de uma terceira substância ao sistema (fármacos, solvente, co-solventes e demais solutos), alterando a mesofase formada e/ou promovendo a transição de fases do sistema (GUO et al., 2010). Dessa forma, considerando que o comprimento da cadeia do lipídio será sempre constante, a conformação do agregado será alterada quando se modifica os valores de **a** e de v. Geralmente, moléculas hidrofílicas favorecem a transição para fase lamelar, enquanto moléculas hidrofóbicas favorecem fase cúbica e hexagonal (SHAH et al., 2001). Isso acontece porque moléculas hidrofílicas, pela sua localização no sistema, aumentam o valor de **a**, diminuindo o valor de *P* e,

consequentemente, favorecendo a fase lamelar. Já a presença de moléculas lipofílicas no sistema aumenta o valor de  $\upsilon$  e, consequentemente, o valor de P, favorecendo as fases cúbica e hexagonal.

Da mesma forma, a presença de água no sistema também altera o valor de P, uma vez que aumenta o domínio polar do sistema, influenciando o valor de a (área da cabeça polar da MO). Quando os sistemas de MO/água entram em contato com água do meio circundante, absorvem água e apresentam intumescimento máximo de até 41% (p/p). Uma vez que o grau de hidratação do sistema influencia a fase líquido-cristalina formada, o intumescimento que ocorre no local de aplicação dos sistemas pode provocar transições de fase e modificar a fase líquido-cristalina do sistema, influenciando também em seu perfil de liberação (BURROWS et al., 1994; CHANG & BODMEIER, 1997b; SHAH & PARADKAR, 2007). É observado que a 25 °C a fase lamelar se forma com baixas concentrações de água, até 15% (p/p) e com aumento do conteúdo de água sofre transição para a fase cúbica, completamente hidratada e estável na presença de excesso de água (LARA et al., 2005).

#### 1.2. Mucoadesão

A mucoadesão apresentada pelos sistemas líquido-cristalinos de MO/água também é uma característica interessante para que os mesmos sejam propostos como sistemas de liberação de fármacos, pois possibilita um contato prolongado do sistema com o local de aplicação (GAJDZIOK et al., 2010).

A adesão é definida como um processo no qual se tem a fixação de uma superfície à outra. Quando a adesão ocorre em um tecido biológico é frequentemente chamada de bioadesão, mas se essa adesão acorre na superfície de uma membrana mucosa, ela é denominada mucoadesão (ANDREWS et al., 2009). Dessa forma, a mucoadesão é a capacidade que algumas substâncias apresentam de aderir a membranas mucosas no corpo humano e permitir uma retenção temporária no local de aplicação (SUDHAKAR et al., 2006).

As membranas mucosas são as superfícies úmidas que revestem as paredes de diversas cavidades corporais, tais como a boca, o trato

gastrointestinal e o trato respiratório e são revestidas pelo muco. Os principais componentes do muco são glicoproteínas, lipídeos, sais inorgânicos e água, que consiste de mais de 95% de seu peso, fazendo com que este seja um sistema altamente hidratado (SMART, 2005). Sistemas mucoadesivos podem ser desenvolvidos para administração em várias mucosas, como a bucal, nasal, ocular, vaginal, retal e periodontal, apesar da mucosa gastrointestinal ser a mais utilizada (CARVALHO, 2009). As vantagens associadas ao uso de mucoadesivos em sistemas de liberação incluem o aumento do tempo de permanência da formulação, melhora da biodisponibilidade do fármaco, redução da freqüência de administração, facilita a administração e remoção da forma farmacêutica, além da possibilidade de direcionar o sistema para um local ou tecido específico no corpo humano (KHUTORYANSKIY, 2011). É possível delinear um sistema mucoadesivo nas mais variadas formas farmacêuticas, uma vez que a propriedade da adesão depende das características do material utilizado para sua preparação (EVANGELISTA, 2006).

Uma das primeiras aplicações de formulações mucoadesivas foi em 1947, quando Scrivener & Schantz (1947) relataram o uso de goma de tragacanto misturado com um adesivo dental para administrar penicilina para a mucosa bucal. Eventualmente, esta aplicação terapêutica de mucoadesivos conduziu a formulação da Orabase<sup>®</sup>. A Orabase<sup>®</sup> é uma pasta usada como sistema de barreira para as úlceras da boca. A formulação mais recentemente desenvolvida foi resultado da combinação de um corticosteróide (acetonida de triancinolona) com o produto Orabase<sup>®</sup> (Omcilon-A em Orabase<sup>®</sup>), que proporciona alívio de úlceras locais na boca por meio de um mecanismo duplo, uma função de barreira e outra função anti-inflamatória (ANDREWS et al., 2009).

A grande maioria de materiais bioadesivos descritos na literatura são polímeros com alto peso molecular, sendo que os mais estudados são os polímeros derivados do ácido poliacrílico, como o policarbofil e os carbômeros, polímeros derivados da celulose, como a hidroxietilcelulose e a carboximetilcelulose, os alginatos, a quitosana e derivados (MORALES & MCCONVILLE, 2011; KHUTORYANSKIY, 2011). Mas um grupo de ésteres de ácido graxo tem sido identificado como uma nova classe de substâncias com

potencial bioadesivo. De especial interesse são os monoglicerídeos, entre eles a monoleína, capaz de formar fases líquido-cristalinas espontaneamente quando em contato com a água, apesar de seu mecanismo de adesão ser diferente do de outros mucoadesivos (NIELSEN et al., 1998; SALLAM et al., 2002; SMART, 2005). A mucoadesão das matrizes líquido-cristalinas pode ser explicada pelas propriedades reológicas destes sistemas, que diminuem a depuração mucociliar e aumentam o tempo de contato da formulação com a mucosa (BRUSCHI et al., 2007; NIELSEN et al., 1998).

O mecanismo de mucoadesão pode ser dividido em dois passos, o estágio de contato e o estágio de consolidação. O primeiro estágio é caracterizado pelo contato entre o mucoadesivo e a membrana mucosa, com espalhamento e intumescimento da formulação, iniciando o contato profundo com a camada de muco (CARVALHO et al., 2010). No segundo estágio, os materiais mucoadesivos são ativados pela presença de umidade. Essencialmente, há duas teorias que explicam a etapa de consolidação, a teoria de difusão e a teoria da desidratação. Segundo a teoria da difusão, as moléculas bioadesivas e as glicoproteínas do muco interagem entre si pela interpenetração de suas cadeias, conduzindo o desenvolvimento de ligações secundárias. De acordo com a teoria da desidratação (Figura 5) materiais que são capazes de gelificar rapidamente em ambientes aquosos, quando colocados em contato com o muco podem causar sua desidratação devido à diferença de pressão osmótica. A diferença no gradiente de concentração atrai a água para dentro da formulação até que um equilíbrio na pressão osmótica seja alcançado. Este processo conduz à mistura da formulação e muco e pode, portanto, aumentar o tempo de contato com a membrana mucosa. Portanto, é o movimento da água que conduz a consolidação da ligação adesiva, e não a interpenetração das cadeias das macromoléculas. No entanto, esta teoria não se aplica para formulações sólidas ou completamente hidratadas (SMART, 2005). Apesar de existir relatos de que o mecanismo de adesão da monoleína é baseado na teoria de desidratação da membrana (DASH et al., 1999), poucas informações são disponíveis sobre o seu mecanismo de mucoadesão.

Região de hidratação da formulação

Direção do movimento de água

Camada de muco desidratada

Mucosa

**Figura 5:** Teoria de desidratação da membrana durante mucoadesão.

Fonte: SMART, 2005.

Alguns métodos *in vivo/ex vivo* são descritos na literatura e podem ser utilizados para medir a força de mucoadesão de sistemas mucoadesivos. A força de mucoadesão se refere à uma medida da força requerida para quebrar a ligação entre uma membrana modelo e o mucoadesivo. Dependendo da direção em que o mucoadesivo é separado do substrato, pode-se obter a força de destacamento, a força de cisalhamento e a força de tensão à ruptura (CARVALHO, F. C., 2009), conforme representado na Figura 6.

**Figura 6:** Representação das forças que podem ser medidas em testes de mucoadesão.

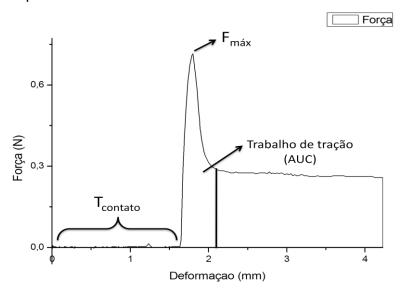


Fonte.: CARVALHO, F. C., 2009.

O equipamento utilizado para determinar a força de mucoadesão é normalmente um analisador de textura ou uma máquina universal de ensaios, o qual mede a força aplicada na remoção da formulação a partir de uma membrana modelo, que pode ser um disco de mucina ou um pedaço de mucosa animal (BRUSCHI et al, 2007; CARVALHO, F. C., 2009). A partir dos resultados obtidos, pode ser construída a curva força-distância, em que são obtidos a força de

separação e o tempo de contato, o trabalho de tração, o pico de força e a deformação do sistema até a ruptura (BRUSCHI et al., 2007; HÄGESTRÖM, 2003). A Figura 7 representa a curva força-distância e indica a deformação do sistema (mm) à medida que a força (N) aumenta para promover o destacamento do sistema da superfície da mucosa. O tempo de contato é o tempo em que ainda não foi observada a deformação do sistema e este ainda não se destacou da mucosa. Neste intervalo de tempo, a força (N) aumenta gradativamente até alcançar a força máxima, a partir da qual o sistema é destacado da mucosa. Neste ponto, a força máxima vai diminuindo até ficar constante e o trabalho é calculado até este ponto, através do cálculo da área sob a curva (AUC) na curva força-distância obtida.

**Figura 7:** Esquema da curva de força (N) *versus* deformação do sistema (mm) e dados obtidos a partir da mesma.



#### 1.3. Aplicação bucal de cristais líquidos

Uma liberação local eficiente de fármacos ou outros ativos para a boca é comprometida por um número de fatores que reduzem drasticamente o tempo de permanência, mais notavelmente as forças de cisalhamento associado com a fala, deglutição e mastigação, bem como de diluição e lavagem causada pela produção contínua de saliva. Tentativas para aumentar o tempo de permanência

e manter a concentração terapêutica ativa dos fármacos têm-se centrado na utilização de sistemas de liberação bioadesivos (ZAMAN et al., 2010; STEINBERG et al., 2005). A mucosa bucal é uma via interessante para a utilização de sistemas de liberação de fármacos mucoadesivos, já que apresenta algumas vantagens como fácil acesso, menor atividade enzimática comparada com a via oral, facilidade de administração e de remoção da forma farmacêutica, aceitação por parte do paciente e baixo nível de irritação na mucosa (PERIOLI et al., 2009).

Neste sentido, sistemas líquido-cristalinos formados por MO/água têm sido propostos para administração de fármacos na mucosa bucal, devido às propriedades como mucoadesão e biodegradabilidade (uma vez que estes sistemas são degradados por esterases liberando ácido oléico e glicerol que são derivados biocompatíveis). NIELSEN et al. (1998) avaliaram o potencial de sistemas de MO/água no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos para utilização na mucosa bucal. Neste estudo, fases precursoras de fase cúbica são administradas na mucosa bucal, onde absorvem água formam е espontaneamente a fase cúbica, que é capaz de sustentar a liberação e manter a mucoadesão. LEE & KELLAWAY (2000a, b, c) também descreveram o potencial de sistemas de MO/água para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos na mucosa bucal, considerando a mucoadesão e capacidade de aumentar a permeabilidade de fármacos na mucosa bucal.

Sistemas líquido-cristalinos de MO/água também têm sido propostos para administração de fármacos dentro da bolsa periodontal. Pelo contato com a saliva e com o fluido crevicular gengival, este sistema se transformam em um sistema de alta viscosidade, chamado cristal líquido ou fase mesomórfica, melhorando sua retenção dentro da bolsa periodontal (BRUSCHI & FREITAS, 2005; ESPOSITO et al., 1996; LEE et al., 2001). NORLING et al. (1992) estudaram um sistema líquido-cristalino de MO usando aditivos que apresentava inicialmente fase hexagonal, sendo capaz de se transformar em fase cúbica *in situ* para a administração de metronidazol na bolsa periodontal. Um sistema precursor de fases líquido-cristalinas contendo micropartículas de própolis para uso no tratamento de doenças periodontais foi descrito e caracterizado quanto às suas propriedades

mecânicas, reológicas e de liberação de fármacos (BRUSCHI et al., 2008; BRUSCHI, 2006). A MO também foi avaliada como veículo para administração de uma proteína recombinante morfogênica com atividade de estimular a regeneração óssea em mandíbula, otimizando a ação da proteína em virtude da capacidade da formulação de adaptar-se aos defeitos ósseos e capacidade de controlar a liberação da proteína (ISSA et al., 2008a,b).

Outro sistema líquido-cristalino formado por diferentes óleos e surfactantes (Cremophor EL, Cremophor RH40 e Mygliol 810) também foi proposto como veiculo para administração de metronidazol dentro da bolsa periodontal (FEHÉR et al., 2008). Sistemas líquido-cristalinos formados por surfactantes (Synperonic A7) e água foram propostos como veículos para administração tópica de clorexedina e seus sais, avaliando-se a influência de diferentes sais de clorexedina na estrutura líquido-cristalina do sistema (FARKAS et al., 2001), assim como o efeito da estrutura líquido-cristalina dos sistemas na liberação do fármaco. Nestes estudos foram obtidas diferentes estruturas líquido-cristalinas de acordo com a composição dos sistemas e com o fármaco incorporado e foi demonstrado que mudanças na estrutura líquido cristalina dos sistemas podem modificar o perfil de liberação do fármaco incorporado (FARKAS et al., 2000; FARKAS et al., 2007). Sistemas líquido-cristalinos também foram avaliados como carreadores para administração tópica de lidocaína e cloridrato de lidocaína para uso na mucosa bucal (MULLER-GOYMANN & FRANK, 1986).

#### 1.4. Estrutura da mucosa oral

A mucosa oral se apresenta de forma diferente dependendo da região da boca considerada. A mucosa mastigatória cobre à área que está envolvida em processos mecânicos, como a fala e mastigação, e inclui a gengiva e palato duro. Esta região mastigatória é estratificada e queratinizada em sua superfície, similar a estrutura encontrada na epiderme, e cobre aproximadamente 25% da boca. A mucosa especializada cobre aproximadamente 15% e corresponde ao dorso da língua. É um tecido estratificado com domínios queratinizados e não queratinizados. Finalmente, a mucosa de revestimento cobre os 60% restantes da

boca, que consiste na parte interna das bochechas, assoalho da boca e parte inferior da língua. Este é um epitélio estratificado e não queratinizado em sua superfície. A mucosa bucal cobre a parte interna das bochechas e é classificada como parte da mucosa de revestimento, com aproximadamente 40-50 camadas de células, resultando em um epitélio com 500-600 µm de espessura e 50,2 cm² de área (MORALES & MCCONVILLE, 2011; SUDHAKAR et al., 2006). Entre os tecidos epiteliais, a mucosa bucal oferece bom desempenho para ação local e sistêmica de fármacos devido à sua permeabilidade. Administração bucal de fármacos se refere à liberação do fármaco dentro/através da mucosa bucal (GIANNOLA et al., 2007). Desta forma, é possível ter um efeito sistêmico ou local do fármaco quando administrado na mucosa bucal.

A mucosa bucal é composta de muitas camadas de diferentes células, como representado na Figura 8. O epitélio é preso às estruturas subjacentes pelo tecido conjuntivo ou lâmina própria, separados pela lâmina basal. E o tecido conjuntivo possui vasos sanguíneos que drenam para as veias lingual, facial e retromandibular, que se abrem na veia jugular interna (MORALES & MCCONVILLE, 2011).

Epitélio

Lâmina basal

Tecido conjuntivo

Figura 8: Diagrama da sessão transversal da mucosa bucal

Fonte: MORALES & MCCONVILLE, 2011.

A principal função do epitélio bucal é a proteção dos tecidos subjacentes. Em regiões não-queratinizadas, a barreira de permeabilidade baseada em lipídios em toda a camada epitelial protege contra a perda de fluidos e entrada de agentes ambientais potencialmente perigosos como antígenos, carcinógenos, toxinas microbianas e enzimas de alimentos e bebidas (SUDHAKAR et al., 2006). Há relatos na literatura de que a barreira à permeação de compostos externos na mucosa bucal esteja relacionada à presença dos grânulos de revestimento de membrana. Estes são descritos como organelas contendo material amorfo que é liberado no espaço intercelular depois da fusão de membrana. Além disso a presença da saliva e do muco também retarda a velocidade e extensão da absorção de fármacos através da mucosa bucal. A permeabilidade entre as diferentes regiões na boca varia em função das diferentes regiões e função. Em geral, a permeabilidade é baseada na espessura e grau de queratinização destes tecidos na seguinte ordem: sublingual > bucal > palatal. (MORALES & MCCONVILLE, 2011; SUDHAKAR et al., 2006).

As células epiteliais da mucosa bucal são revestidas por uma substância intercelular chamada muco, com uma espessura variável de 40 a 300 µm. É produzido pelas glândulas sublingual e glândula salivar menor e acredita-se que ele desempenhe um importante papel na adesão de sistemas de liberação mucoadesivos. Além disso, a saliva também forma uma camada de revestimento sobre a superfície da mucosa, com espessura de aproximadamente 70 µm. A saliva é produzida pelas glândulas salivares menores e maiores e, em condições normais, tem uma razão de fluxo de 1-2 mL/min. É composta de 99,5% de água, além de proteínas, glicoproteínas e eletrólitos, com um pH normal de 5,6-7. Ainda, contem as enzimas α-amilase (quebra 1-4 ligações glicosídicas), lisozima (proteção, digere a parede da célula bacteriana) e lipase lingual (quebra as gorduras). A saliva tem muitas funções na boca: hidratação, iniciar a digestão, proteger a quebra dos dentes e, também, controlar a flora bacteriana. Outro fator importante de grande preocupação é o papel da saliva no desenvolvimento da cárie dental. Enzimas salivares agem como polímeros polissacarídicos naturais que aceleram o crescimento de mutantes de Streptococcus e outras bactérias formadoras do biofilme que conduz ao desenvolvimento da cárie e demais infecções bucais (SUDHAKAR et al., 2006).

### 1.5. Microflora bucal residente

O termo microflora residente é usado para descrever quaisquer organismos que são normalmente isolados de uma área. Micro-organismos que têm potencial para causar doença são denominados "patógenos" e aqueles que causam doença somente em condições excepcionais são denominados "patógenos oportunistas", sendo que muitos micro-organismos presentes na boca têm a capacidade de comportar-se dessa maneira (MARSH & MARTIN, 2005).

A maioria dos indivíduos sofre, em algum momento de sua vida, episódios localizados de doenças na boca causados por desequilíbrio na composição bucal residente. As manifestações clínicas mais comuns de tais desequilíbrios incluem as cáries dentárias e as doenças periodontais. As doenças periodontais constituem um grupo de desordens nas quais os tecidos de suporte dos dentes são atacados; o estágio inicial é denominado gengivite e, na falta de tratamento adequado, pode eventualmente levar à queda do dente. Já a cárie dentária é a dissolução do esmalte do dente por ácido, produzido principalmente pelo metabolismo de carboidratos da dieta pelas bactérias ligadas à superfície do dente no biofilme. A formação do biofilme está diretamente ligada com a formação da cárie dental. O biofilme é uma comunidade de micro-organismos irreversivelmente presos a uma superfície e que contem uma matriz exopolimérica (MARSH & MARTIN, 2005).

Dependendo de fatores tais como a dieta e a remoção mecânica regular do biofilme, o tipo de microbiota predominante na boca pode variar (TORRES, et.al. 2000). Os agentes etiológicos principais do biofilme dental são os *Streptococcus sp.* e os *Actinomices sp.* (ZANIN et. al, 2007). O *Streptococcus mutans* é o microorganismo considerado como principal agente etiológico da cárie dental, residente no biofilme aderido à superfície dos dentes. Já a presença do *Staphylococcus aureus* como componente da microbiota bucal é controversa, mas estudos demonstraram que algumas infecções na boca são causadas, em parte, por esse micro-organismo, sendo isolado de sítios subgengivais de pacientes com periodontite (ANÍBAL, 2007).

A higienização diária é o primeiro método adotado para controle da microbiota envolvida na formação do biofilme. Apesar do grande esforço dos profissionais de saúde bucal, a cárie ainda é muito prevalente na população geral (LEE et al., 2010). Muitos indivíduos removem apenas 60%, aproximadamente, do biofilme presente na superfície dos dentes após a escovação. Essa falta de habilidade em manter uma higiene bucal eficiente é observada em resultados de pesquisas epidemiológicas que relatam que a prevalência de gengivite e de outras infecções bucais é muito alta em várias populações. Globalmente, a gengivite ocorre em 50% a 90% dos adultos. Nos Estados Unidos a gengivite tem ocorrido em 48% das pessoas com idade entre 35 e 44 anos, e 85% dos adultos têm um dente com cárie ou uma obturação (HU et al, 2009).

Apesar de raramente ameaçar a vida, as cáries dentárias e as doenças periodontais têm grande significado clínico em razão de sua alta prevalência na população em geral e altos custos para os serviços de saúde associados ao seu tratamento. Além disso, acumulam-se evidencias sugerindo que estas condições podem ter impacto na saúde geral de um indivíduo. As doenças periodontais, por exemplo, podem representar um fator de risco para a doença cardiovascular, ou para bebês prematuros e de baixo peso (MARSH & MARTIN, 2005).

Neste sentido, muitos antimicrobianos têm sido sugeridos como auxiliares na prevenção de infecções bucais. Todos os agentes antimicrobianos atualmente disponíveis possuem algumas vantagens e limitações específicas, que são mais frequentemente relacionados com o desejo de minimizar a toxicidade potencial ao tecido, enquanto maximiza a atividade antibacteriana (RATHKE et al., 2010).

O Triclosan (2,4,4'-tricloro-2 hidroxidifenileter) é um agente antimicrobiano sintético de largo espectro de ação, não-catiônico e apolar, que foi aprovado para uso em produtos de higiene oral em 1997 (CHIAPPETTA et al., 2008). Exibe atividade contra uma vasta gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, leveduras e mesmo parasitas responsáveis pela malária e toxoplasmose. É um dos agentes preferidos para tratamento de infecções bucais, devido à sua potente atividade contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* e espécies de *Actinomicetos*, que têm um papel importante na etiologia das condições dentárias (JUG et al., 2011). Seu

mecanismo de ação é baseado na inibição do sítio ativo de uma enzima específica, enoil-ACP redutase (Fabl), reduzindo a captação e metabolismo de glicose pelas bactérias da boca, impedindo que o micro-organismo sintetize ácido graxo necessário na formação da membrana celular, além de reduzir a integridade da membrana bacteriana (HOQ & IBRAHIM, 2011; GARDINER et al.,2008). Devido ao seu espectro de ação e perfil de segurança favorável, tem sido utilizado nas ultimas duas décadas em vários produtos de higiene oral (SHARMA et al., 2003). No entanto, o principal obstáculo no desenvolvimento de formulações tópicas contendo o Triclosan é sua baixa solubilidade em água e, desta forma, várias estratégias têm sido realizadas no sentido de garantir a adequada solubilidade do fármaco (CHIAPPETTA et al., 2008).

O cloreto de cetilpiridínio (CCP) é um sal quaternário de amônio, eficiente no controle do biofilme dental, que tem sido muito utilizado em produtos de higiene oral (HU et al. 2009). CCP tem atividade bactericida contra micro-organismos gram-positivos e, em altas concentrações, contra gram-negativos. Também possui boa atividade contra algumas espécies de fungos, como por exemplo, Candida albicans (GAJDZIOK et al., 2010). São encontrados vários trabalhos na literatura que relatam a atividade de largo espectro do CCP em vários microorganismos, incluindo bactérias e fungos encontrados no biofilme dental (AL-MUSALLAM et al., 2006; ALVES et al., 2011; FERES et al., 2010). Ao serem carregados positivamente, tornando-se catiônicos, ligam-se com facilidade aos tecidos bucais, no entanto, sua substantividade é inferior à da clorexidina (ALVES et al., 2011). Sua segurança e eficácia foram avaliadas por estudos de citotoxicidade. Age primariamente penetrando na membrana da célula, o que causa a perda dos componentes do interior da célula, rompimento do metabolismo bacteriano, inibição do crescimento da célula e, finalmente, morte bacteriana ou fúngica (AL-MUSALLAM et al., 2006). Além disso, o CCP tem ação inibitória contra a frutosiltransferase, uma enzima extracelular que sintetiza frutanos da sacarose. Estes desempenham um importante papel na progressão da cárie dental por servir como um reservatório de nutrição extracelular para as bactérias (LEE et al., 2010). É um efetivo agente antimicrobiano classificado na categoria I para segurança e eficácia pela Food and Drug Administration (FDA). Nos Estados Unidos é utilizado como enxaquatório há mais de 70 anos e normalmente é utilizado em produtos de higiene oral com concentração entre 0,01% a 0,1% (HU et al. 2009; ALVES et al, 2011).

O polihexametileno biguanida (PHMB), como um membro da família das guanidinas poliméricas, é um agente antimicrobiano de largo espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, amplamente utilizado, com baixa toxicidade e alta compatibilidade aos tecidos (ROSIN et al., 2001; FENG et al., 2011). Seu mecanismo de ação se baseia na atração das moléculas catiônicas do PHMB pela superfície negativamente carregada dos microorganismos, provocando uma falha no mecanismo de defesa da célula e ruptura da parede celular, impedindo a ligação microbiana às superfícies. Fosfolipídios neutros, por outro lado, não são ou são pouco afetados pelo PHMB, por isto possuem baixa toxicidade contra células humanas (HÜBNER & KRAMER, 2010). O PHMB tem sido usado por muitos anos como agente antimicrobiano na medicina. Vários trabalhos têm demonstrado que enxaquatórios bucais à base de PHMB inibem a formação do biofilme e reduzem a contaminação na boca, sugerindo que esta solução pode ser uma alternativa para prevenção do biofilme dental (ROSIN et al., 2001; ROSIN et al., 2002; NASCIMENTO et al, 2008; WELK et al., 2005).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de sistemas de liberação de fármacos mucoadesivos formados por cristais líquidos de MO/água para veiculação de antimicrobianos bucais.

### 2.1. Objetivos específicos

- Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos à base de MO/água contendo antimicrobianos com aplicabilidade bucal.
- Avaliação da estrutura líquido-cristalina apresentada pelos sistemas.
- Estudo do intumescimento dos sistemas líquido-cristalinos desenvolvidos em presença de saliva artificial.
- Estudo de liberação in vitro dos fármacos dos sistemas selecionados.
- Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos sistemas selecionados.
- Estudo das propriedades mucoadesivas *ex vivo* dos sistemas líquidocristalinos selecionados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

A monoleína utilizada foi uma preparação comercial de monoglicerídeos derivados de óleo de canola denominada Myverol 18-99, contendo 98,1% de monoglicerídeos (Kerry do Brasil). Foi utilizado CCP Synth®, Triclosan®, gentilmente cedido pela empresa SANiFill® e Cosmocil CQ Arch Química® (solução de PHMB 20% p/v). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

#### 3.2. Métodos

### 3.2.1. Desenvolvimento dos sistemas líquido-cristalinos contendo os antimicrobianos estudados

Foram desenvolvidas formulações à base de MO e água em proporções adequadas para obtenção da fase lamelar (FL) (proporção MO/água de 90/10) e fase cúbica (FC) (proporção MO/água de 70/30) de acordo com LARA (2001), aos quais foram incorporados antimicrobianos com aplicabilidade bucal. Foram avaliados os antimicrobianos: CCP (0,05%; 2,5% e 5,0% e 8,0% p/p), Triclosan® (0,3%; 2,0% e 5,0% p/p) e PHMB (0,2%; 2,0% e 5,0% p/p). As concentrações inicialmente avaliadas de 0,05%, 0,3% e 0,2% para CCP, Triclosan® e PHMB, respectivamente, foram escolhidas baseadas na concentração usual desses fármacos em enxaquatórios bucais. As formulações foram preparadas por fusão da MO a 60°C e adição de água nas quantidades requeridas à mesma temperatura. O Triclosan® foi dissolvido na MO e os demais fármacos na água, devido às suas solubilidades. Os sistemas foram deixados em repouso por 24 horas para equilíbrio para verificação das fases líquido-cristalinas formadas (LARA et al., 2005).

### 3.2.2. Avaliação da formação das fases líquido-cristalinas

### 3.2.2.1. Microscopia de luz polarizada

Os sistemas foram observados por microscopia de luz polarizada e a identificação destas fases foi feita de acordo com TYLE (1989) e ROSEVEAR (1954), além da avaliação do aspecto macroscópico dos sistemas. Foi utilizado microscópio óptico Axiopan 2 (Carl Zeizz AG, Alemanha) equipado com filtro polarizador e acoplado à câmera digital Axiocan HRC.

Foram avaliados os sistemas líquido-cristalinos de FL e FC com e sem a presença dos fármacos nas concentrações descritas acima. Os sistemas foram avaliados quanto à formação de cristais líquidos e à identificação das fases líquido-cristalinas na presença dos fármacos após 24 horas e 7 dias de preparo.

### 3.2.2.2. Análise por difração de raios a baixo ângulo (SAXS)

Os sistemas líquido-cristalinos de FL sem a incorporação dos fármacos e com a presença do PHMB na concentração de 2,0% (p/p) também foram analisados por medidas de espalhamento de raios X a baixos ângulos. Os sistemas foram analisados no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS), em Campinas (SP), com a colaboração da Prof.ª Dr.ª Márcia Carvalho de Abreu Fantini, na linha de luz DO2A-SAXS2.

As medidas do ângulo de espalhamento 20 foram realizadas utilizando  $\lambda$  = 0,1608 nm. As medidas de intensidade foram realizadas em função do vetor de espalhamento q (q = ( $4\pi sin$  0)/ $\lambda$ ). As amostras foram acondicionadas em suporte, entre folhas de Kapton. As análises foram realizadas em um detector de filamentos bidimensional, por um período de 100 segundos. Os resultados experimentais foram corrigidos pela presença do detector. A transmissão das amostras e do suporte isolado com as folhas de Kapton foi medida e os dados de SAXS foram normalizados pela transmissão em cada caso, bem como foi removido o espalhamento das folhas de Kapton do espalhamento das amostras.

As estruturas líquido-cristalinas foram identificadas através da lei de Bragg (BRAGG, 1913), calculando os valores das distâncias interplanares, *d*. A simetria da estrutura foi determinada associando a distância interplanar aos Índices de Miller (DONG & BOYD, 2011).

### 3.2.3. Avaliação do intumescimento ("swelling")

O intumescimento dos sistemas foi avaliado gravimetricamente por dois métodos: imersão (LEE et al., 2003) e hidratação por contato em esponja (BERTRAM & BODMEIER, 2006), usando como meio de hidratação saliva artificial (NAKOMOTO, 1979), cuja composição está descrita na Tabela I. Em ambos os métodos avaliou-se o intumescimento da FL e da FC com e sem a adição dos fármacos, (CCP, Triclosan<sup>®</sup> e PHMB) nas concentrações estudadas.

No método de imersão, 1 g do sistema foi acondicionado em suportes cilíndricos de PVC com membrana hidrofílica de acetato de celulose acoplada em uma das extremidades. Os suportes contendo as amostras foram imersos em saliva artificial mantida à 37°C por sistema de banho-maria. Após 30 minutos de imersão, a membrana foi retirada das amostras que já apresentavam aspecto sólido, continuando a imersão até 24 horas. A absorção de água foi determinada pelo aumento do peso da amostra após a imersão.

No método da esponja, uma esponja laminada (7,5 cm x 11,5 cm x 2,0 cm, densidade 23, Veneza<sup>®</sup>) totalmente hidratada com saliva artificial foi colocada em uma placa de Petri (d= 14,8 cm e h=3,0 cm) preenchida com 100 mL de saliva artificial a fim de manter a esponja embebida durante todo o experimento. Um papel de filtro redondo (d = 3 cm, J'Prolab<sup>®</sup>) também foi embebido no meio de hidratação e posicionado na parte superior da esponja. Este conjunto experimental foi deixado em repouso por 30 minutos para entrar em equilíbrio. Posteriormente, pesou-se quantidade conhecida dos sistemas (0,3 g) sobre o papel de filtro e a placa de Petri foi mantida fechada e à temperatura ambiente.

Tabela I: Composição química da saliva artificial.

Componentes	Quantidade
Fosfato de potássio dibásico anidro	0,8020 g
Fosfato de potássio monobásico anidro	0,3626 g
Sorbitol 70%	42,700 g
Cloreto de potássio	0,6250 g
Cloreto de sódio	0,8650 g
Cloreto de magnésio.6H <sub>2</sub> O	0,125 g
Cloreto de cálcio.2H <sub>2</sub> O	0,0720 g
Nipagin	1,80 g
Nipazol	0,20 g
Propilenoglicol	10 mL
Água purificada q.s.p.	1000 mL
Fonte: NAKOMOTO 1979	

Fonte: NAKOMOTO, 1979.

Em ambos os métodos, em tempos determinados (30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas) os suportes cilíndricos e os papéis de filtro foram pesados. A porcentagem de água absorvida pelas formulações foi calculada pela diferença de peso antes e após a imersão. Após 24 horas de intumescimento, as amostras também foram analisadas macroscopicamente e por microscopia de luz polarizada para identificação das fases líquido-cristalinas formadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os dados obtidos nos estudos de intumescimento foram avaliados de acordo com SCHOTT (1992) e foram submetidos a modelos matemáticos para caracterização da cinética de intumescimento, aplicando as equações de cinética de primeira-ordem e cinética de segunda-ordem:

$$\ln \frac{W_{\infty}}{W_{\infty} - W} = kt$$
(2)

$$\frac{t}{W} = \frac{1}{kW_{\infty}^2} + \frac{t}{W_{\infty}} \tag{3}$$

No modelo de primeira ordem, deve ser encontrada uma relação linear quando é plotado lnW∞/(W∞-W) em função do tempo, onde W∞ é a capacidade máxima de intumescimento, W é o intumescimento em um tempo determinado t e (W∞-W) é o intumescimento não realizado. Já no modelo de segunda ordem, deve ser encontrada linearidade quando plotado t/W em função do tempo. A capacidade máxima e a velocidade de intumescimento foram determinadas graficamente. De acordo com modelo de segunda ordem, a capacidade de intumescimento (captação máxima de água) pode ser calculada pelo recíproco da inclinação da reta e a velocidade de intumescimento é dada pelo recíproco do intercepto do gráfico (SCHOTT, 1992; LEE et al., 2003).

### 3.2.4. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana

A técnica empregada para avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas selecionados frente às bactérias padrão foi a do poço-difusão em camada dupla de ágar, descrita por GROVE & RANDALL (1955) e UTYAMA et al. (2006).

As bactérias padrão utilizadas neste estudo foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) resistente à meticilina – MRSA, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990), *Streptococcus mutans, Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa e Candida albicans* (ATCC 10231).

O meio de cultura *Mueller Hinton Agar* (12 mL) foi distribuído em placas de Petri (20x100mm) esterilizadas para formar as camadas base. Após a solidificação do meio, preparou-se a camada *seed* (semeada). Para preparo da camada *seed*, alíquotas de 2 ml dos diferentes inóculos microbianos padronizados (escala 0,5 de MacFarland~10<sup>8</sup>UFC/mL) foram adicionados ao *Mueller Hinton Agar* (20mL) para obtenção de 1% do inóculo microbiano Então, 8ml da camada *seed* foi formada sobre a camada base. Em seguida, com a camada *seed* solidificada, foram confeccionados poços com diâmetros de 5,0 mm, com auxilio de canudos esterilizados, em cada placa de Petri. Esses poços foram preenchidos com, aproximadamente, 0,03g dos sistemas líquido-cristalinos

desenvolvidos, contendo ou não os fármacos estudados, e 20 µL das soluções dos fármacos nas mesmas concentrações de estudo. As placas de Petri foram pré-incubadas a temperatura ambiente (25°C) por 2h para permitir a difusão dos produtos no meio de cultura. Decorrido o período de pré-incubação, as placas foram incubadas a 37°C por 24h em estufa, ressaltando o uso de papel absorvente entre o fundo e a tampa das placas de Petri, com o intuito de evitar o contato da água de condensação com o meio de cultura. A leitura dos diâmetros dos halos de inibição dos sistemas estudados foi realizada com auxilio de régua milimétrica e os resultados expressos em milímetros.

A atividade antibacteriana de uma solução de clorexedina nas concentrações de 0,12% (p/p) foi utilizada como controle positivo e a FC sem adição dos fármacos foi utilizada como controle negativo.

Avaliou-se a atividade antimicrobiana da FC de CCP na concentração de 0,05% com proporção de água/MO de 40/60, após 24 horas, 8 e 19 dias de preparo. Em vista dos resultados obtidos para atividade antimicrobiana e liberação *in vitro*, avaliou-se posteriormente a atividade antimicrobiana da FC nas concentrações de 2,5% e 5,0% (p/p) após 24 horas de preparo.

Posteriormente, foi avaliada a atividade antimicrobiana da FC contendo 0,2%, 2,0% e 5,0% (p/p) de PHMB e 0,3 % e 2,0% (p/p) de Triclosan<sup>®</sup> na proporção de 40/60 de água/MO, após 24 horas de preparo.

Soluções dos fármacos nas mesmas concentrações do ensaio foram usadas para comparação e os testes foram realizados em duplicata, em ambiente asséptico em fluxo laminar.

### 3.2.5. Validação da metodologia de quantificação do PHMB, CCP e Triclosan®

A validação da metodologia de quantificação dos fármacos foi realizada de acordo com a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, avaliando-se os seguintes parâmetros: linearidade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, exatidão e limites de quantificação e detecção.

A validação foi realizada em tampão fosfato pH 7,4 isotônico para os fármacos CCP e PHMB e em tampão fosfato pH 7,4 isotônico com adição de 2,0% (v/v) de Tween 20 para o Triclosan<sup>®</sup>. Os fármacos foram quantificados por espectrofotometria UV-VIS em espectrofotômetro UV-VIS Femto 800 XI à 259, 236 e 282 nm, respectivamente, para CCP, PHMB e Triclosan<sup>®</sup>.

#### 3.2.5.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Para a determinação da linearidade, foram feitas análises de cinco concentrações diferentes (variando-se de 2,5 a 15 µg/mL) e construída uma curva padrão média que representa a média das cinco determinações (n=5). O valor mínimo do coeficiente de correlação (r) deve ser 0,99.

#### 3.2.5.2. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

A precisão intra-corrida (repetibilidade) foi avaliada em três concentrações diferentes (baixa (2,5 μg/mL), média (7,5 μg/mL) e alta (15 μg/mL)) com 5 réplica de cada (n=5) e a precisão inter-corridas (precisão intermediária) foi avaliada nas mesmas concentrações em cinco dias diferentes (n=5).

A precisão foi expressa como Desvio Padrão Relativo (DPR) segundo a equação:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Na fórmula, DP é o Desvio Padrão, e CMD é a Concentração Média Determinada. O valor máximo aceitável para o DPR é de 5%.

### 3.2.5.3. Limite de Detecção

O Limite de Detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas e foi determinado pela equação:

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC}$$

Na fórmula, LD é o Limite de Detecção, DP é o Desvio Padrão obtido a partir da análise de 10 amostras de branco e IC é a inclinação da curva.

### 3.2.5.4. Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas e foi determinada pela equação:

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

Na fórmula, LQ é o Limite de Detecção, DP é o Desvio Padrão obtido a partir de 10 amostras de branco e IC é a inclinação da curva de calibração.

#### 3.2.5.5. Exatidão

A exatidão do método foi verificada em três concentrações (baixa (2,5 μg/mL), média (7,5 μg/mL) e alta (15 μg/mL)), com cinco réplicas cada e foi expressa entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Para o cálculo da Exatidão Intra-corrida, as 5 réplicas foram obtidas num mesmo experimento. Para o cálculo de Exatidão Inter-corridas, as 5 réplicas foram obtidas em dias diferentes.

$$Exatid\Tilde{a}o = \frac{Concentra\Tilde{a}o\ M\'edia\ Experimental}{Concentra\Tilde{a}o\ Te\'orica} \times 100$$

### 3.2.6. Determinação da solubilidade dos fármacos estudados

Em volume de 30 mL da solução receptora usada nos estudos de liberação (tampão fosfato isotônico pH 7,4 isotônico com 2,0% de Tween 20 para o Triclosan<sup>®</sup> e apenas o tampão fosfato para o CCP e PHMB) adicionou-se quantidade dos fármacos em excesso sob agitação por 24 horas em agitador magnético. Posteriormente, a solução obtida foi centrifugada (Centrifuge 5430R – Eppendorf, a 7800 rpm, 50 min para o Triclosan<sup>®</sup> e 10 min para CCP e PHMB) e a concentração dos fármacos na solução sobrenadante foi quantificada por espectrofotometria UV-VIS em espectrofotômetro UV-VIS Femto 800 XI à 259 nm, 282 nm e 236 nm para o CCP, Triclosan<sup>®</sup> e PHMB, respectivamente.

### 3.2.7. Avaliação do perfil de liberação in vitro dos fármacos estudados

### 3.2.7.1. Condições do estudo do perfil de liberação in vitro

O estudo de liberação in vitro dos fármacos foi realizado em aparelho de dissolução (Dissolutor Sotax) adaptado com aparato contendo membrana, sob agitação constante (50 rpm) e temperatura controlada de 37±0,5°C (LARA, 2001). Foi utilizado como solução receptora tampão fosfato isotônico pH 7,4 para os fármacos CCP e PHMB e o mesmo tampão com adição de 2,0% (p/v) de Tween 20 para o Triclosan<sup>®</sup>, respeitando as condições de sink, conforme solubilidade determinada espectrofotometricamente após saturação da solução receptora com o fármaco (Item 3.2.6.). Foi utilizado 1 g dos sistemas desenvolvidos para cada cuba e amostras da solução receptora foram coletadas periodicamente até 24 hr com reposição do mesmo volume a cada coleta (3,0mL). A quantidade de fármaco liberada foi quantificada por espectrofotometria UV-VIS em espectrofotômetro UV-VIS Femto 800 XI, segundo metodologia validada.

### 3.2.7.2. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* dos sistemas contendo CCP

### 3.2.7.2.1. Estudo do perfil de liberação in vitro

Inicialmente foi estudado o perfil de liberação do sistema de FC na concentração de 0,05% de CCP usando membrana de diálise de acetato de celulose, (Dialysis Tubing Fisherbrand). Foram utilizados 100 mL de solução receptora e a quantidade de CCP liberada foi quantificada espectrofotometricamente à 259 nm. Em vista dos resultados obtidos, avaliou-se, em seguida, o perfil de liberação do sistema de FL contendo CCP nas concentrações de 2,5 e 5,0%, nas mesmas condições de ensaio.

### 3.2.7.2.2. Avaliação da membrana utilizada no estudo de liberação in vitro

Foram avaliadas as membranas: acetato de celulose (Ficherbrand, Dialysis Turbing), poliéstersulfona, éster de celulose e nitrato de celulose (Millipore Indústria e Comércio Ltda), através do estudo de recuperação do CCP à partir de uma solução à 5,0% em tampão fosfato isotônico pH 7,4 e nas mesmas condições de ensaio do estudo do perfil de liberação *in vitro* do fármaco.

Em função dos resultados, foi analisado o perfil de liberação do sistema de FL na concentração de 2,5% de CCP utilizando a membrana de éster de celulose por ter apresentado melhor resultado no ensaio de recuperação de CCP à partir da solução à 5%.

### 3.2.7.2.3. Avaliação da interferência da MO no método de quantificação do CCP

Para avaliar a possível interferência da MO no método de quantificação do CCP por espectrofotometria, foi realizado um ensaio onde 50 mL da solução

receptora contendo concentração conhecida de CCP (35 μg/mL) foi deixada em contato com 1g da FC sem adição de fármaco por 24 horas. O sistema foi mantido à temperatura de 37°C, sob agitação, seguindo mesmo modelo usado no estudo de liberação *in vitro*. Amostras de 3 mL foram coletadas em tempos prédeterminados (30 min, 2, 4, 6 e 24 horas) e a quantidade de CCP em solução foi quantificada por espectrofotometria UV-VIS em espectrofotômetro UV-VIS Femto 800 XI à 259 nm.

### 3.2.7.2.4. Estudo da absorção de CCP em MO

Para avaliação da absorção do CCP em MO, um béquer de vidro de 20 mL contendo 0,6g de MO foi mantido em banho-maria até completa fusão da MO, seguida pela sua solidificação à temperatura ambiente. Em seguida, 20mL de uma solução pré-aquecida do fármaco em tampão fosfato de sódio pH 7,4 isotônico, de concentração conhecida (96 µg/mL), foi adicionada sobre o filme de MO formado no fundo do béquer. A concentração do fármaco foi selecionada de forma que poderia ser medida espectrofotometricamente sem a necessidade de diluição. O estudo de absorção foi conduzido em banho-maria à temperatura de 37 °C e amostras de 3,0 mL foram coletadas em tempos pré-determinados de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas. A redução na concentração do fármaco na solução foi quantificada por espectrofotometria UV-VIS em espectrofotômetro UV-VIS Femto 800 XI à 259 nm.

O mesmo ensaio foi realizado empregando-se uma solução de CCP em tampão de HCl 0,2M pH 1,2 para avaliação da influência do pH na absorção do fármaco em MO (CHANG & BODMEIER, 1997a).

### 3.2.7.3. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* dos sistemas contendo PHMB

O estudo do perfil de liberação *in vitro* dos sistemas de FL e FC contendo PHMB nas concentrações de 0,2%, 2,0% e 5,0% (p/p) foram realizados usando membrana de acetato de celulose (Fisherbrand, Dialysis Tubing). Foram utilizados

250 mL de solução receptora e a quantidade de fármaco liberada foi quantificada espectrofotometricamente à 236 nm. O perfil de liberação do PHMB a partir de uma solução na concentração de 2,0% (p/v) em água foi avaliado e utilizado como controle.

### 3.2.7.4. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* dos sistemas contendo Triclosan®

O estudo do perfil de liberação *in vitro* dos sistemas de FL e FC contendo Triclosan<sup>®</sup> na concentração de 0,3% (p/p) foi avaliada usando membrana FH (Fluoropore), Millipore Indústria e Comércio Ltda., e 100 mL da solução receptora. O perfil de liberação *in vitro* da fase hexagonal (FH) (com teor inicial de água de 10% e 30% (v/p), na concentração de 2,0% (p/p) de Triclosan<sup>®</sup> também foi avaliado, utilizando 350 mL de solução receptora. A quantidade de fármaco liberada foi quantificada espectrofotometricamente à 282 nm.

## 3.2.7.5. Avaliação do mecanismo de liberação dos sistemas contendo PHMB e Triclosan®

A cinética de liberação foi determinada por análise de regressão linear dos gráficos aplicando o modelo de cinética de ordem-zero (quantidade de fármaco liberado versus tempo), o modelo de Higuchi (quantidade de fármaco liberado versus a raiz quadrada do tempo) e modelo de primeira ordem (log da quantidade remanescente do fármaco liberado *versus* tempo).

No modelo de liberação controlado por difusão a quantidade cumulativa do fármaco, Q, por unidade de área do sistema é proporcional à raiz quadrada do tempo, t, onde K é a constante de liberação (HIGUCHI, 1962):

$$Q = Kt^{1/2}$$
 (4)

Para distinguir entre a liberação controlada pelo modelo de difusão e pelo modelo de primeira ordem, os dados foram analisados pelo método proposto por

Schwartz et al. (1968). Neste modelo, se o gráfico da razão de liberação em função da quantidade de fármaco liberada (Q) for linear, a liberação segue modelo de 1ª ordem, enquanto que, se o gráfico da razão de liberação como função do recíproco de Q for linear, a liberação é controlada pela difusão.

A influência do intumescimento na liberação do PHMB foi caracterizada usando modelo proposto por RIGTER & PEPPAS, (1987):

$$\frac{M^t}{M_{\infty}} = Kt^n \tag{5}$$

onde  $M_t/M_\infty$  é a fração de fármaco liberada, K a constante dependente do sistema, t o tempo de liberação e n é o expoente difusional, indicativo do mecanismo de liberação de diferentes sistemas que intumescem ou não. Para sistemas com moderado intumescimento em forma de filme, valores de n < 0,5 indicam difusão de Fick, valores entre 0,5 e 1,0, indicam transporte anômalo e valores maiores que 1,0 indicam mecanismo de relaxação caso II.

# 3.2.8. Avaliação *ex vivo* das propriedades de mucoadesão em mucosa de bochecha de porco

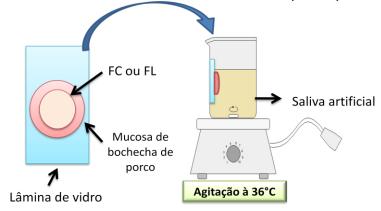
### 3.2.8.1. Tratamento e obtenção da mucosa de bochecha de porco

A mucosa da bochecha de porco foi adquirida do Frigorífico Olhos D'água Indústria e Comércio de Carnes Ltda, Ipuã, SP. As bochechas foram cortadas em segmentos de 5-6 cm e mantidas congeladas (-20 °C) até o dia do ensaio por um período máximo de 30 dias. No dia do ensaio, o tecido muscular foi removido com bisturis, tendo o cuidado de manter a integridade da mucosa. As mucosas foram cortadas em segmentos menores (área = 12 cm²) e mantidas em solução salina 0,9% sob refrigeração até a hora do ensaio.

# 3.2.8.2. Avaliação do tempo de permanência *ex vivo* dos sistemas líquido-cristalinos em mucosa bucal

Foi avaliado o tempo de permanência *ex vivo* em mucosa bucal para os sistemas de FC e FL sem adição dos fármacos, de acordo com PERIOLI et al. (2009). Para isso, um segmento da mucosa de bochecha de porco (área = 2,25 cm²) foi colado na superfície de uma lâmina de vidro usando cola de cianoacrilato. A superfície da mucosa foi umidificada com 1 gota de saliva artificial, sobre a qual foi espalhada uma fina camada das amostras de FL e de FC (aproximadamente 0,1 g). A lâmina de vidro foi fixada verticalmente na parede de um béquer de vidro preenchido com 50 mL de saliva artificial, para que a amostra ficasse completamente imersa na saliva. O sistema foi mantido à 37 °C e sob agitação, conforme esquema indicado na Figura 9. O tempo necessário para o destacamento dos sistemas à partir da superfície da mucosa foi monitorado.

**Figura 9:** Representação da metodologia para avaliação do tempo de permanência *ex vivo* em mucosa de bochecha de porco para FL e FC.



### 3.2.8.3. Avaliação da força de mucoadesão ex vivo em mucosa bucal

Foi avaliada a força de mucoadesão *ex vivo* para a MO e para os sistemas de FL e FC com diferentes teores iniciais de água, assim como para os sistemas de FL e FC com adição de PHMB na concentração de 2,0% e 5,0% (p/p) e Triclosan<sup>®</sup> na concentração de 5,0% (p/p), após 24 horas de preparo. Os ensaios

foram realizados na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, no Laboratório Interno de Pesquisa em Biocompatibilidade de Materiais com a colaboração do Prof. Dr. Vinícius Pedrazi e da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Cândido dos Reis.

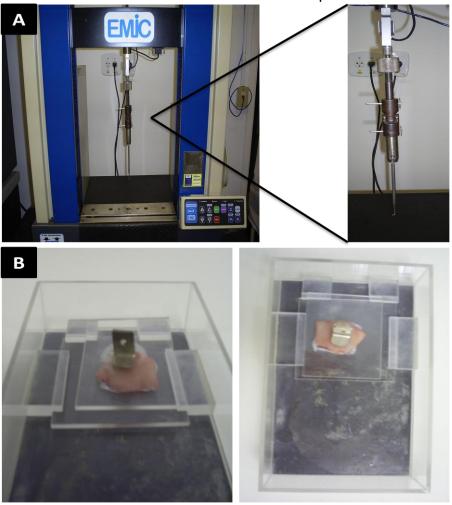
A máquina universal de ensaios modelo Emic DL2000 com célula Trd19 (10Kg) (Figura 10A) foi utilizada para medir a força de destacamento dos sistemas líquido-cristalinos de MO/água quando colocados em contato com a mucosa de bochecha de porco.

Sobre um suporte retangular de acrílico (Figura 10B) foi colado um segmento da mucosa de bochecha de porco com cola de cianoacrilato com a camada de muco voltada para cima. Sobre essa mucosa, 3 g das amostras estudadas foram espalhadas em uma camada fina e lisa. Um segundo suporte de acrílico foi posicionado sobre a amostra para permitir uma força de contato constante entre os tecidos e a amostra. O suporte inferior ficou embebido em uma solução de saliva artificial (NAKAMOTO, 1979), para manter a amostra e o tecido hidratados. Amostra e tecido foram usados apenas uma vez e foram realizadas 5 leituras para cada amostra.

O experimento foi realizado sob temperatura controlada de 37 °C. A área de contato foi de, aproximadamente, 12,0 cm². A força de contato estabelecida foi de 1,0 N e o tempo de contato 10 min. Após o tempo de contato o suporte superior de acrílico foi retirado a uma velocidade de 0,5 mm.s<sup>-1</sup>.

O pico da força de destacamento foi calculado automaticamente pelo software Tesc versão 3.01 e o trabalho de adesão (mJ), o indicador mais preciso do desempenho de sistemas mucoadesivos, foi calculado através da área sob a curva do gráfico força máxima de destacamento (N) *versus* deformação do sistema (mm). E o trabalho de adesão por cm² (mJ.cm⁻²) foi calculado dividindo o valor do trabalho de adesão (mJ) pela área da mucosa usada no ensaio, 12,0 cm².

**Figura 10:** Equipamento utilizado para determinação da força de destacamento *ex vivo* para os sistemas líquido-cristalinos: A) Máquina universal de ensaios e B) Suportes de acrílico com mucosa de bochecha de porco.



#### 3.2.9. Análise dos resultados

Os resultados obtidos nos ensaios da avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana foram submetidos à análise estatística. Os dados apresentados são resultados de uma média ± desvio padrão. As comparações múltiplas foram realizadas pela análise de variância paramétrica de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação Tukey-Kramer, para determinação do nível de significância das diferenças. Os resultados possuem 95% como mínimo de confiança, sendo uma diferença significativa menor que 5,0% (p < 0,05).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Desenvolvimento e avaliação da formação das fases líquidocristalinas contendo antimicrobianos com aplicabilidade bucal

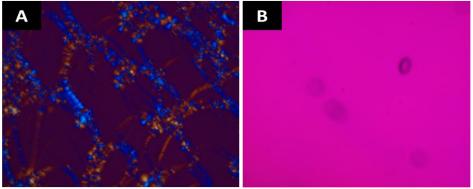
A identificação das fases líquido-cristalinas formadas por sistemas de MO/água é fundamental no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, uma vez que a estrutura da mesofase do sistema usado como veículo pode influenciar a liberação de um fármaco nele incorporado (IBRAHIM, 1989). Como a adição de um composto (fármaco) pode ter efeito profundo nas propriedades de fase do sistema, é essencial caracterizá-lo na presença do fármaco durante o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos utilizando sistemas líquido-cristalinos (LARA et al.,2005). A formação de fases líquido-cristalinas nos sistemas desenvolvidos em presença dos fármacos foi avaliada para verificar se o fármaco interfere na formação das fases líquido-cristalinas.

### 4.1.1. Microscopia de luz polarizada

As fases líquido-cristalinas apresentam texturas particulares quando observadas em microscopia de luz polarizada, o que permite a identificação das mesmas por esta técnica. A FL apresenta-se macroscopicamente como um gel turvo ou translúcido e, quando observado por microscopia de luz polarizada, apresenta-se como um sistema anisotrópico (birrefringente) com textura de cruzes de Malta isoladas ou reunidas em cordões. Já a FH, também apresenta anisotropia e birrefringência sob luz polarizada, porém com texturas angulares na forma de estrias. A FC, por sua vez, apresenta-se como um gel rígido, transparente e isotrópico (não birrefringente) sob luz polarizada (SEDDON, 1990; TATE et al., 1991; QIU & CAFFREY, 2000; BENDER et al., 2008).

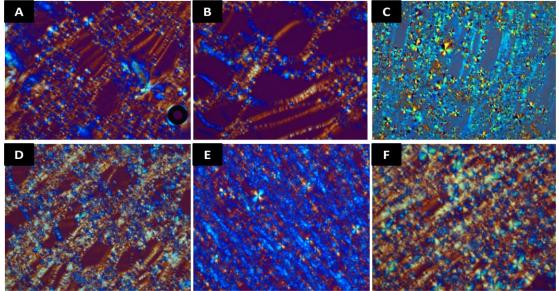
Os sistemas de MO/água na proporção 70/30 sem o fármaco apresentaramse isotrópicos e com aspecto macroscópico característico de FC e os sistemas na proporção 90/10 apresentaram-se anisotrópicos com textura característica de FL, como era esperado (Figura 11). Na avaliação dos sistemas contendo CCP (0,05, 2,5 e 5,0% p/p) e PHMB (0,2, 2,0 e 5,0% p/p), também foram obtidas FL e FC após 24 de preparo, indicando que a presença dos fármacos nessas concentrações não influenciou na formação das respectivas fases (Figura 12). Para o Triclosan<sup>®</sup>, apenas quando adicionado ao sistema na concentração de 0,3% (p/p) foram obtidas FL e FC após 24 de preparo (Figura 13). No entanto, nas concentrações de 2,0% e 5,0% (p/p), observou-se a formação da FH, tanto na proporção de água/MO de 10/90 quanto 30/70, após 24 hrs de preparo (Figura 13). Este resultado indica que a presença do Triclosan<sup>®</sup> alterou o comportamento de fases desse sistema, promovendo uma transição de fases. Este comportamento é explicado pela propriedade hidrofóbica do fármaco, que favorece a formação da FH (KUMAR et al., 2004).

**Figura 11:** Fotomicrografias de A) FL e B) FC sem adição dos fármacos após 24 horas de repouso.



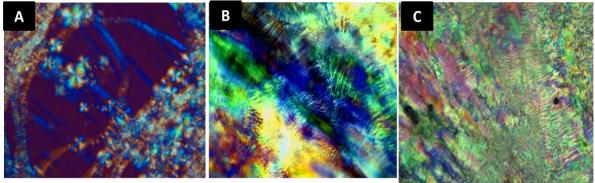
<sup>\*</sup>Aumento de 30 vezes no microscópio de luz polarizada.

**Figura 12:** Fotomicrografias de FL com A) PHMB 0,2%; B) PHMB 2,0%; C) PHMB 5,0%; D) CCP 0,05%; E) CCP 2,5% e F) CCP 5,0% após 24 horas de repouso.



<sup>\*</sup>Aumento de 30 vezes no microscópio de luz polarizada.

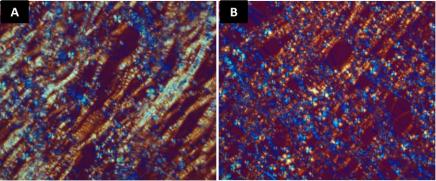
**Figura 13:** Fotomicrografias dos sistemas líquido-cristalinos formadas após adição do Triclosan<sup>®</sup>: A) FL com 0,3%; B) FH com 2,0% e C) FH com 5,0%, após 24 horas de repouso.



<sup>\*</sup>Aumento de 30 vezes no microscópio de luz polarizada.

Em maiores concentrações de CCP, a partir de 8%, não foi observado formação da FL após 24 hrs de repouso, e a FC também não se formou nessas concentrações, em vez disso, foi observada a FL. Além disso, na concentração de 5,0% de CCP e PHMB, a FC sofreu transição para FL após 7 dias de avaliação (Figura 14). Esta transição de fases em decorrência da alta concentração do CCP e PHMB pode ser explicada pela propriedade polar dos fármacos, uma vez que fármacos polares favorecem a formação da FL. Este comportamento é observado porque fármacos muito hidrofílicos interagem com a água do sistema, diminuindo a quantidade de água livre para interagir com a MO (KUMAR et al., 2004). Simultaneamente, a presença dos mesmos também aumenta o domínio polar do sistema, devido à sua localização nos canais de água, alterando, desta forma, o valor do parâmetro de empacotamento (P) e, consequentemente o comportamento de fases do sistema (CABOI et al., 2001).

**Figura 14:** Fotomicrografias de FL de A) CCP 5,0% e B) PHMB 5% após 7 dias de repouso.



Aumento de 30 vezes no microscópio de luz polarizada.

Muitos autores encontraram modificações nas fases líquido-cristalinas formadas por MO/água, bem como alterações nas propriedades do sistema devido a adição de fármacos e solventes (SALLAM et al., 2002; ENGSTROEM & ENGSTROEM, 1992; KUMAR et al., 2004; RIZWAN et al, 2009; CHANG & BODMEIER, 1998). Foi demonstrado, por exemplo, que a presença de ácido oléico, que dissolve na bicamada lipídica, aumenta o volume hidrofóbico aparente do lipídeo, transformando a mesofase. Isto é devido a interação do fármaco com a bicamada lipídica curva da FC sobre certas concentrações, fazendo com que a FC fique instável, o que resulta na transição para a FH (RIZWAN et al. 2009). Ainda, a presença do fármaco lipofílico, diazepan, favoreceu a formação da FC e FH quando sua concentração foi aumentada no sistema, enquanto o fármaco hidrofílico, maleato de clorfeniramina, favoreceu a formação da FL (KUMAR et al., 2004). Engstrom & Engstrom (1992) mostraram que a incorporação de cloridrato de lidocaína promoveu a transição de FC em FL, em contraste, a base livre da lidocaína converteu FC em FH. Sallam et al. (2002) avaliou o efeito da adição de furosemida (1-20%) no diagrama de fases da MO. Foi verificado que a FH não se formou em altas temperaturas quando o fármaco foi incorporado na concentração de 5,0%, mas em baixas concentrações não foi observado nenhuma alteração. Chang & Bodmeier (1998) avaliaram o efeito de diferentes fármacos (maleato de clorfeniramina e cloridrato de propranolol) e solventes (etanol, propilenoglicol 300, propilenoglicol, 2-pirrolidona e N-metil-2-pirrolidona) no comportamento de fases da MO a fim de obter sistemas menos viscosos para administração parenteral. Ambos os fármacos promoveram a transição da FC para a FL em altas concentrações e todos os solventes alteraram o diagrama de fases, promovendo a formação de fases menos viscosas com aumento da concentração.

### 4.1.2. Análise de difração de raios a baixo ângulo (SAXS)

Os sistemas líquido-cristalinos de MO/água na proporção 90/10 com e sem adição do PHMB na concentração de 2,0% também foram analisados por difração de raios X a baixo ângulo. Foi escolhido apenas este sistema para análise por SAXS em função dos resultados da avaliação das propriedades mucoadesivas (discutidos no Item 4.6.).

Esta técnica é usada para detectar a difração de ângulos θ<10°, que correspondem a distâncias interplanares com dimensões nanométricas. Esta faixa de tamanho contém informações sobre a estrutura, tamanho e estrutura interna de macromoléculas e mais uma grande variedade de estruturas, como as encontradas em cristais líquidos liotrópicos (DONG & BOYD, 2011).

A difração de raios X é baseada na interferência causada por um objeto no caminho de ondas eletromagnéticas. Quando as dimensões do objeto são comparáveis aos comprimentos de onda da radiação, ocorre a difração. Os raios X possuem comprimento de onda comparável ao espaçamento entre grupamentos formadores dos cristais, por isso a técnica pode ser utilizada para identificação de fases líquido-cristalinas (ATKINS, 1998). Ao incidir um feixe de raios X em um cristal, o mesmo interage com os átomos presentes, originando o fenômeno de difração. A difração de raios X ocorre segundo a Lei de Bragg (Equação 6), a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram (característicos para cada fase cristalina):

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta$$
 (6)

Onde,

n: número inteiro

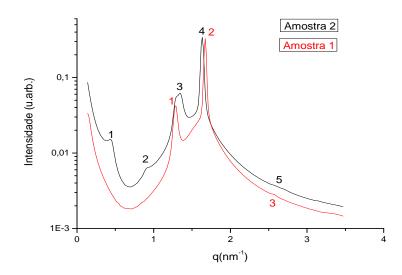
λ: comprimento de onda dos raios X incidentes

d: distância interplanar

θ: ângulo de difração

Se a radiação espalhada satisfaz a condição de Bragg, irá produzir intensidades muito fortes conhecidas como picos de Bragg no padrão de difração, que é usado para determinar as propriedades estruturais da amostra. Os picos de Bragg aumentam em q-valores ( $q_1$ ,  $q_2$ ,  $q_3$ ...) seguindo a relação  $q_1$ ,  $q_2$  =  $2q_1$ ,  $q_3$  =  $3q_1$ , ... para FL, a estrutura de interesse neste estudo, segundo o Índice de Muller (GODDEERIS et al., 2010). A Figura 15 mostra a intensidade (u. arb.) versus q (nm<sub>-1</sub>) obtidos dos padrões de difração SAXS dos sistemas líquidocristalinos com e sem a adição de 2,0% (p/p) de PHMB após 48 horas de preparo.

**Figura 15:** Difratogramas de raios X dos sistemas líquido-cristalinos de MO e água (90/10) com e sem a adição de 2,0% (p/p) de PHMB, linhas preta e vermelha, respectivamente.



A análise dos picos de reflexão forneceu as razões entre as distâncias interplanares e permitiu determinar o parâmetro de rede (a), bem como identificar a fase formada e verificar se houve interferência do fármaco no comportamento de fases do sistema, conforme apresentado na Tabela II. O parâmetro de rede de uma fase líquido-cristalina é a medida da distância entre as micelas, portanto, fornece informações úteis em relação à sua estrutura interna (AMAR-YULI et al., 2007).

**Tabela II:** Dados obtidos através da análise por SAXS dos sistemas líquidocristalinos de MO/água (90/10) com e sem adição de 2,0% de PHMB.

Amostra	q (nm <sup>-1</sup> )	d (nm)	Razão	Parâmetro de rede (nm)	Estrutura
1.FL	1,2789	4,9131	1:1	4,9131	Lamelar 1
	1,6722	3,7574	1:1	3,7574	Lamelar 2
	2,5638	2,4507	1:1/2	4,9015	Lamelar 1
	3,3375	1,8826	1:1/2	3,7652	Lamelar 2
2.FL + 2,0% PHMB	1,2884	4,8919	1:1	4,8919	Lamelar 1 <sup>a</sup>
	1,3421	4,6816	1:1	4,6816	Lamelar 1B
	1,6329	3,8478	1:1	3,7574	Lamelar 2
	2,5770	2,4382	1:1/2	4,8764	Lamelar 1 <sup>a</sup>
	2,7081	2,3201	1:1/2	4,6403	Lamelar 1B
	3,1802	1,9757	1:1/2	3,9514	Lamelar 2

d: distância interplanar;

q: vetor de espalhamento.

A indexação dos picos de reflexão obtidos caracterizou o sistema composto por MO e água na proporção de 90/10 como FL, com reflexões características em  $q_1 = 1,2789 \text{ nm}^{-1}$ ,  $q_2 = 2,5638 \text{ nm}^{-1}$  ( $2q_1$ ) e  $q_3 = 3,3375 \text{ nm}^{-1}$  ( $3q_1$ ), confirmando os resultados da microscopia de luz polarizada. O mesmo resultado foi observado para o sistema composto por MO é água na proporção de 90/10 com adição de 2,0% (p/p) de PHMB, concluindo que a presença do fármaco, nesta concentração, após 24 horas de preparo não alterou a formação da mesofase.

Ao observamos os difratogramas (Figura 15) pode-se verificar picos mais largos, o que pode sugerir a coexistência de fases, caracterizadas como lamelar 1 e 2 na Tabela II. Caboi et al. (2001) relataram a possibilidade de coexistência de fases para a FC sem ser detectada por difração de raios X. Para afirmar a presença de mais de uma fase, deve-se realizar uma modelagem matemática para visualizar picos sobrepostos.

Além disso, houve uma pequena redução do parâmetro de rede após adição de 2,0% de PHMB. A partir dos dados da Tabela II, verifica-se que a média do parâmetro de rede de FL 1 é de 4,9073± 0,0082 nm, e as médias para a FL 1A e 1B são, respectivamente, 4,884 ± 0,011 nm e 4,661 ± 0,029 nm. Isto sugere que o PHMB esteja inserido na fase 1B, não na fase 1A, cujo parâmetro de rede é similar ao da FL1. Mudança no parâmetro de rede indica mudança na estrutura do cristal, sem, no entanto, provocar transição de fase. Aumento no parâmetro de rede pode ser ocasionado por hidratação da estrutura, presença de moléculas hidrofílicas nos domínios aquosos, aumentando o domínio polar da MO, ou ainda a presença de moléculas anfifílicas entre os grupamentos polares e apolares das micelas (AMAR-YULI et al., 2007; AMAR-YULI et al., 2008; LIBSTER et al., 2007). Desta forma, um aumento no parâmetro de rede sugere que moléculas adicionadas ao sistema estejam localizadas no interior da estrutura líquidocristalina. A redução do parâmetro de rede pode ser devido à desidratação do domínio aquoso do sistema, ao passo que o parâmetro de rede permanece inalterado pela adição de substâncias hidrofóbicas na estrutura (AMAR-YULI et al., 2007). A FL é uma estrutura unidimensional paralela, em forma de bicamadas, de forma que a parte polar da MO fica em contato com os canais de água. Sendo assim, o PHMB está localizado nos canais de água, aumentando o volume desta região e, consequentemente, deveria aumentar a distância interplanar e o parâmetro de rede. No entanto, foi observado que a adição do PHMB diminuiu o parâmetro de rede. Este resultado pode ser explicado pela característica altamente hidrofílica do fármaco, que pode interagir com a água do sistema, desidratando-o e diminuindo o parâmetro de rede. Este mesmo resultado foi obtido com a adição de substâncias hidrofílicas e catiônicas em sistemas de MO e água (MANO, 2012).

### 4.2. Avaliação do intumescimento ("swelling")

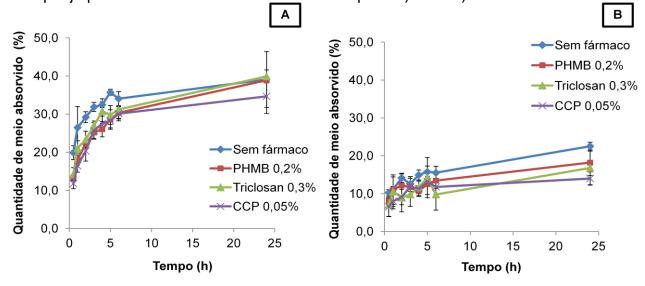
### 4.2.1. Efeito do teor inicial de água e da adição dos fármacos

O intumescimento das matrizes é um parâmetro importante que pode influenciar no perfil de liberação dos fármacos (SHAH & PARADKAR, 2007). Quando os sistemas de MO/água entram em contato com água do meio circundante, absorvem água e apresentam intumescimento máximo de até 41% (p/p). Uma vez que o grau de hidratação do sistema influencia a fase líquidocristalina formada, o intumescimento que ocorre no local de aplicação dos sistemas pode provocar transições de fase e modificar a fase líquido-cristalina do sistema, influenciando também em seu perfil de liberação (BURROWS et al., 1994; CHANG & BODMEIER, 1997b; SHAH & PARADKAR, 2007). É observado que a 25 °C a FL se forma com baixas concentrações de água, até 15% (p/p) e com aumento do conteúdo de água sofre transição para a FC, completamente hidratada e estável na presença de excesso de água (LARA et al., 2005). Desta forma, foram avaliados os sistemas de FC e FL com e sem presença dos fármacos estudados, por dois métodos. Muitos trabalhos avaliaram e caracterizaram o intumescimento através da imersão (CHANG & BODMEIER, 1997b; LEE et al, 2003; SHAH & PARADKAR, 2007). Nesse método, o sistema fica completamente imerso na saliva artificial, enquanto que na hidratação por contato em esponja, a quantidade de saliva é limitada pelo uso da mesma, simulando a aplicação na mucosa bucal.

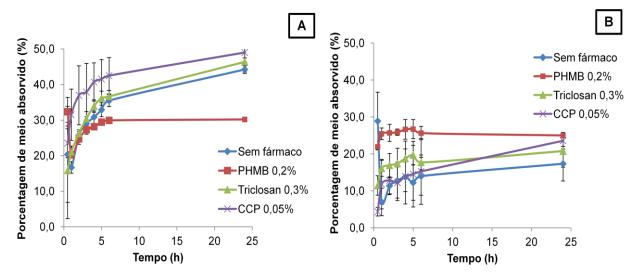
A porcentagem média de intumescimento dos sistemas contendo CCP 0,05%, Triclosan<sup>®</sup> 0,3% e PHMB 0,2% está apresentada nas Figuras 16 e 17, para os métodos de hidratação por contato em esponja e de imersão,

respectivamente. Foi verificado que todos os sistemas apresentaram um intumescimento rápido, sendo que a captação de água pela FL foi maior do que pela FC para todos os sistemas, devido ao fato desta possuir menor teor inicial de água (10%), enquanto que o teor inicial da FC estava mais próximo do teor de água em equilíbrio no sistema de MO/água (40%). Vários autores mostram que a captação de água em sistemas líquido-cristalinos constituídos por MO é maior com teores iniciais de água menores, mostrando que a razão de intumescimento é inversamente proporcional ao teor inicial de água dos sistemas (LARA et al, 2001; LEE et al, 2003; GERAGHTY et al, 1996; CHANG & BODMEIER, 1997; RIZWAN et al, 2009). Além disso, a FC geralmente apresenta menor capacidade de absorção de água do que a FL devido à alta viscosidade da FC, que dificulta a difusão de água para o interior do sistema (KUMAR et al, 2004; RIZWAN et al, 2009).

**Figura 16:** Perfil de intumescimento pelo método de hidratação por contato em esponja para os sistemas com e sem fármaco para A) FL e B) FC.



**Figura 17:** Perfil de intumescimento pelo método de imersão para os sistemas com e sem fármaco para A) FL e B) FC.



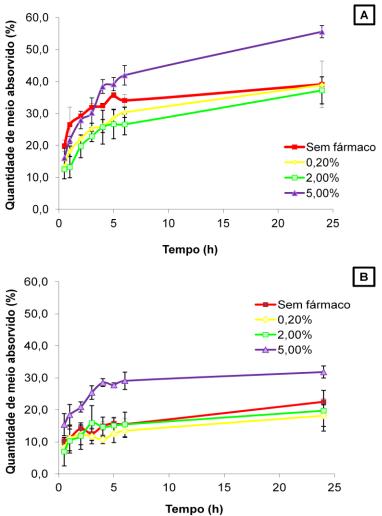
A inflexão no perfil de intumescimento depois de 20-25% de água pode ser atribuída à formação da FC, que é altamente viscosa e age como um fator limitante do intumescimento adicional da captação de água. O rápido intumescimento dos sistemas indica que a formação da FC foi um processo rápido, sugerindo que a liberação do fármaco, como descrito à seguir, ocorre primariamente da FC. Após 24 horas de intumescimento todos os sistemas testados apresentaram-se como um sistema isotrópico devido à quantidade de água permeando dentro da FL. A maior quantidade de água dentro do sistema altera o parâmetro de empacotamento (P), como discutido no item 1.1., o que provoca uma transição de fases, e todas as amostras do sistema de FL apresentaram-se como FC após 24 horas de intumescimento. O mesmo foi observado por LARA et al (2005), levando à conclusão de que a MO absorve água até atingir o teor de água no equilíbrio, quando passa de uma FL para uma fase isotrópica viscosa, que demonstrou ser a FC. O principal fator que leva à transição de fases pelo aumento do conteúdo de água é a tendência da bicamada lipídica se curvar saindo de uma configuração planar (FL). Isso acontece porque a hidratação do sistema tende a expandir o arranjo da região do domínio polar da MO, gerando um desequilíbrio nas forças de estresse lateral nessa região e, a fimde aliviar o estresse resultante dessas diversas forças dentro da bicamada, esta tende a se curvar, de maneira a criar interconexões múltiplas, que corresponde à FC bicontínua (SEDDON, 1990).

Vários autores relatam que a adição de fármacos altera a captação de água de sistemas de MO/água de maneira particular para cada fármaco, devido às propriedades específicas de cada um (CHANG & BODMEIER, 1997b; KUMAR et al., 2004; CABOI et al., 2001). No entanto, foi observado que nas concentrações inicialmente avaliadas de 0,2%, 0,3% e 0,05% de PHMB, Triclosan® e CCP, respectivamente, os valores de intumescimento destes sistemas foram similares aos da FC e FL sem adição dos fármacos. Desta forma, podemos afirmar que a presença destes fármacos, nestas concentrações, não influenciou a porcentagem de intumescimento final dos sistemas.

### 4.2.2. Avaliação do efeito da concentração do PHMB

Foi realizado um estudo do efeito da concentração do PHMB na taxa de intumescimento do sistema, usando apenas o modelo de hidratação por contato em esponja. A adição do fármaco a 0,2 e 2,0% (p/p) não influenciou a porcentagem de intumescimento, no entanto, a 5,0% (p/p) a capacidade de intumescimento apresentou um aumento expressivo (Figura 18). Como o PHMB é um fármaco hidrofílico, o aumento do intumescimento pode ter ocorrido ou pela afinidade do fármaco pela água ou porque fármacos hidrofílicos favorecem formação de FL, com maior capacidade de absorver água que a FC (KUMAR et al., 2004). Foi observado nos resultados de microscopia que, após 7 dias de avaliação, a FC na concentração de 5,0% de PHMB sofreu transição para FL. Este resultado sugere, portanto, que com a presença do fármaco hidrofílico, o sistema apresenta uma tendência em sofrer transição de FC para FL e uma transição mais lenta da FL para a FC durante intumescimento, provocando um aumento no intumescimento com aumento da concentração do PHMB (KUMAR et al., 2004).

**Figura 18:** Perfil de intumescimento pelo método de hidratação por contato em esponja para os sistemas com diferentes concentrações de PHMB A) FL (razão 10/90 de água/MO) e B) FC (razão 30/70 de água/MO).



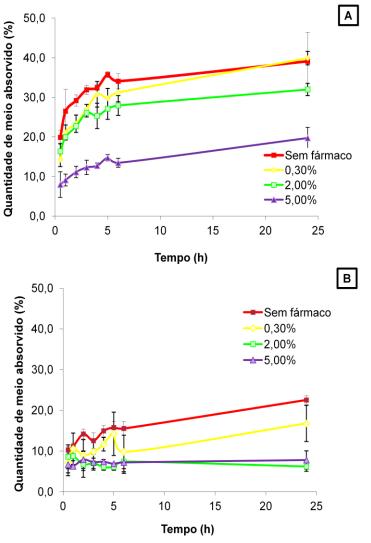
### 4.2.3. Avaliação do efeito da concentração do Triclosan®

Foi realizado um estudo do efeito da concentração do Triclosan<sup>®</sup> na taxa de intumescimento do sistema, usando apenas o modelo de hidratação por contato em esponja. Os resultados indicam que à medida que aumentou a concentração do fármaco no sistema, de 0,3% para 5,0% (p/p), a porcentagem de intumescimento diminuiu (Figura 19). Este resultado pode ser explicado pela transição da FL e FC para FH à partir da adição de 2,0% do fármaco ao sistema. Na concentração de 0,3% de Triclosan<sup>®</sup>, foi possível obter a FL e FC com os teores iniciais de água de 10% e 30%, no entanto em concentrações maiores a FH foi obtida independentemente do teor inicial de água. Desta forma, nestas

concentrações, o intumescimento ocorreu à partir da FH e ao final do experimento, foi verificado por microscopia de luz polarizada que as amostras ainda se apresentavam como FH. Apenas a amostra com teor inicial de água de 10% contendo 2,0% do fármaco apresentou como FC após 24 hrs de ensaio.

Resultado semelhante foi encontrado por Kumar et al (2004) ao avaliar o intumescimento de sistemas de MO contendo fármacos polares e apolares. Foi verificado que o intumescimento diminui na presença de fármacos apolares e aumenta na presença de fármacos polares. Os mesmos resultados foram observados para os fármacos avaliados neste estudo, Triclosan<sup>®</sup> e PHMB.

**Figura 19:** Perfil de intumescimento pelo método de hidratação por contato em esponja para os sistemas com diferentes concentrações de Triclosan<sup>®</sup> com teor inicial de água de A) 10% e B) 30%.



#### 4.2.4. Avaliação do efeito da concentração do CCP

Para o CCP não foi realizado o estudo do efeito da concentração do fármaco no intumescimento devido aos resultados obtidos no estudo do perfil de liberação *in vitro* e na determinação da atividade antibacteriana *in vitro*.

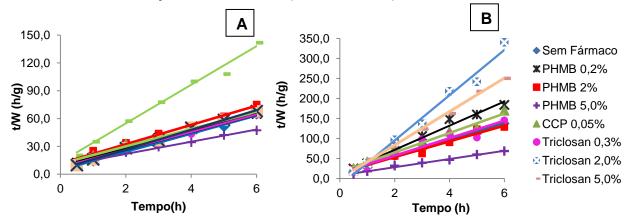
## 4.2.5. Caracterização da cinética de intumescimento

Todos os sistemas estudados, nas duas metodologias avaliadas, apresentaram intumescimento segundo cinética de 2ª ordem, uma vez que foi obtida linearidade de acordo com este modelo (Figuras 20 e 21). Os coeficientes de correlação linear obtidos para os modelos de 1ª e 2ª ordem para as duas metodologias estudadas estão apresentados nas Tabelas III e IV.

**Tabela III:** Valores dos coeficientes de correlação linear segundo modelos de 1ª e 2ª ordem (SCHOTT, 1992) para os sistemas líquido-cristalinos estudados pelo método de hidratação por contato em esponja.

Sistema	1ª (	Ordem	2ª Ordem		
	FL	FC	FL	FC	
Sem fármaco	0,945	0,925	0,995	0,986	
PHMB 0,2%	0,968	0,630	0,993	0,984	
PHMB 2%	0,964	0,848	0,989	0,974	
PHMB 5%	0,980	0,816	0,992	0,991	
<b>CCP 0,05%</b>	0,985	0,747	0,994	0,979	
Triclosan <sup>®</sup> 0,3%	0,412	0,580	0,994	0,921	
Triclosan <sup>®</sup> 2,0%	0,914	0,629	0,997	0,984	
Triclosan <sup>®</sup> 5,0%	0,971	0,364	0,988	0,996	

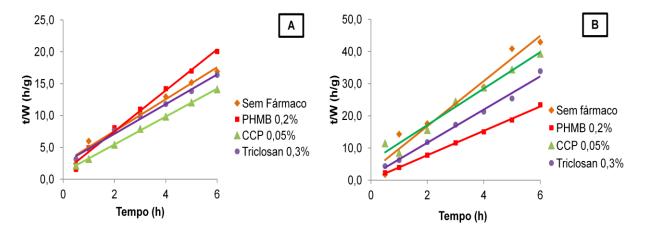
**Figura 20:** Intumescimento segundo cinética de 2ª ordem para os sistemas líquido-cristalinos pelo método de hidratação por contato em esponja: A) FL e B) FC, com e sem adição dos fármacos (SHOTT, 1992).



**Tabela IV:** Valores dos coeficientes de correlação linear segundo modelos de 1ª e 2ª ordem (SCHOTT, 1992) para os sistemas líquido-cristalinos estudados pelo método imerso.

Sistema _	1ª (	Ordem	2ª Ordem		
	FL	FC	FL	FC	
Sem fármaco	0,962	0,669	0,978	0,955	
PHMB 0,2%	0,978	0,252	0,991	0,998	
<b>CCP 0,05%</b>	0,978	0,840	0,999	0,972	
Triclosan <sup>®</sup> 0,3%	0,916	0,538	0,994	0,990	

**Figura 21:** Intumescimento segundo cinética de 2ª ordem para os sistemas líquido-cristalinos pelo método de imersão: A) FL e B) FC com e sem adição dos fármacos (SHOTT, 1992).



É relatado que muitas matrizes poliméricas usadas como sistemas de liberação de fármacos apresentam intumescimento de acordo com cinética de 1ª ordem. Segundo este modelo, a taxa de intumescimento é controlada pela difusão e segue a Lei de Fick, assim o intumescimento ocorre sem nenhuma limitação ao

intumescimento subsequente. Desta forma, o intumescimento em um dado tempo (t) é diretamente proporcional ao intumescimento médio que ainda deve ocorrer antes do intumescimento máximo ser alcançado (SCHOTT, 1992). No entanto, sistemas líquido-cristalinos de MO e água tiveram seu intumescimento caracterizado por vários autores e apresentaram cinética de acordo com modelo de 2ª ordem (CHANG & BODMEIER, 1997; LEE et al., 2003; SCHOTT, 1992). Neste modelo, a velocidade de intumescimento é diretamente proporcional à dois fatores. O primeiro é a quantidade relativa de captação de água (Ca) ainda não realizada num tempo t. O intumescimento progressivo expande o domínio amorfo e aumenta o estresse no domínio cristalino. O estresse no domínio cristalino oferece uma resistência à Ca subsequente, aumentando à medida que a Ca se torna mais intensa e diminuindo a taxa de captação. E o segundo fator é a área limite interna específica (A<sub>int</sub>), esta inclui todos os sítios que ainda não interagiram com água, mas que serão hidratados á medida que o intumescimento ocorre. À medida que a Ca ocorre, a Aint diminui e, desta forma, diminui a taxa de captação (SCHOTT, 1992).

A partir da equação de cinética de 2º ordem pode-se obter os valores da capacidade máxima e velocidade inicial de intumescimento. As unidades da capacidade máxima e velocidade inicial de intumescimento são g<sub>matriz</sub>/g<sub>solução</sub> e h.g<sub>matriz</sub>/g<sub>solução</sub>, respectivamente (LEE et al., 2003). Os valores da capacidade máxima (g/g) e velocidade inicial (h.g/g) de intumescimento estão representados na Tabela V. Observa-se que a capacidade máxima de intumescimento aumentou com a redução do teor inicial de água nos sistemas líquido-cristalinos e com o aumento da concentração de PHMB, mas diminuiu com o aumento da concentração do Triclosan<sup>®</sup>, conforme discutido no item anterior.

**Tabela V:** Valores de capacidade máxima (g/g) e velocidade inicial (h.g/g) de intumescimento para os sistemas líquido-cristalinos estudados segundo modelo de cinética de intumescimento de 2ª ordem.

	Método Hidratação em Esponja				Método Imerso			
Fármaco	F	'L	FC		FL		FC	
	C <sub>máx</sub>	Vi	C <sub>máx</sub>	Vi	C <sub>máx</sub>	Vi	C <sub>máx</sub>	Vi
Sem fármaco	0,1018	0,2220	0,0476	0,0826	0,3997	0,3923	0,1425	0,3618
PHMB 0,2%	0,1032	0,1098	0,0331	0,0880	-	-	-	-
PHMB 2%	0,0962	0,0861	0,0509	0,0715	0,3112	0,9074	0,2642	5,1282
<b>PHMB 5%</b>	0,1517	0,1153	0,0981	0,1270	-	-	-	-
<b>CCP 0,05%</b>	0,1064	0,0899	0,0411	0,0611	0,4562	0,9372	0,1767	0,1715
Triclosan <sup>®</sup> 0,3%	0,1052	0,1339	0,0458	0,0750	0,4296	0,4049	0,1939	0,7508
Triclosan <sup>®</sup> 2,0%	0,0942	0,1854	0,0177	0,0555	-	-	-	-
Triclosan <sup>®</sup> 5,0%	0,0480	0,0768	0,0239	5,4171	-	-	-	-

C<sub>máx</sub>: capacidade máxima de intumescimento

V<sub>i</sub>: velocidade inicial de intumescimento.

As diferenças encontradas entre as duas metodologias para a capacidade máxima de intumescimento indicam que o intumescimento foi influenciado pela metodologia empregada, o que pode ser explicado pela menor razão de difusão da saliva observada no método por hidratação por contato em esponja. Resultados semelhantes foram relatados por Lee (2003). Foi observada maior porcentagem de intumescimento no método imerso porque a temperatura é controlada, usa-se maior quantidade de amostra e o sistema está imerso na saliva. No entanto, o método de hidratação por contato em esponja apresentou perfis semelhantes ao método imerso, como discutido anteriormente, com a vantagem de simular a aplicação na mucosa bucal.

## 4.3. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana

Para determinação da atividade antimicrobiana de todos os sistemas estudados, foi avaliada a inibição do crescimento para um amplo número de bactérias e levedura patogênicas. Dentre estes, destacam-se os microorganismos *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, que estão intimamente envolvidos com infecções da boca. Os demais micro-organismos foram escolhidos para avaliação mais ampla da atividade antimicrobiana, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo que o *Staphilococcus aureus* e

a *Pseudomonas aeruginosa* são bactérias transientes da boca (MARSH & MARTIN, 2005).

É importante destacar que o método de difusão em ágar pode ser utilizado apenas para a avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana. Como o fenômeno de difusão depende das propriedades físico-químicas do produto e do meio de cultura utilizado, a ausência do halo de inibição do crescimento pode não ser indicativo da ausência de atividade antimicrobiana.

Apenas os sistemas de FC, na proporção de água/MO de 40/60 (completamente hidratados) foram escolhidos para a avaliação da atividade antibacteriana. Como os sistemas estudados possuem a capacidade de captar água do meio e o intumescimento provoca aumento no volume do sistema, optouse por usar neste ensaio sistemas completamente hidratados para não haver o risco de rachar o meio de cultura durante intumescimento, como observado por Perioli et al., (2009), ao avaliar a atividade antimicrobiana do metronidazol liberado à partir de um sistema de liberação lenta contendo guitosana.

## 4.3.1. Atividade antibacteriana *in vitro* para os controles positivo e negativo

Como a clorexidina é um antimicrobiano largamente utilizado na prática odontológica (BLUCHER, 2007), foi avaliada sua atividade antimicrobiana na concentração de 0,12% (p/p), a mesma concentração utilizada em antissépticos comercialmente disponíveis. Os halos de inibição obtidos foram, então, utilizados como controle positivo e padrão de comparação para os sistemas líquidocristalinos estudados. Além disso, o sistema de FC (40/60) sem adição dos fármacos foi utilizado como controle negativo neste estudo.

A FC não apresentou capacidade de inibir o crescimento de nenhum dos micro-organismos testados e os halos de inibição obtidos para a solução de clorexidina 0,12% estão apresentados na Tabela VI.

**Tabela VI:** Média dos halos de inibição (mm) ± desvio padrão obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de uma solução de clorexidina na concentração de 0,12% (p/p) - controle positivo.

Micro-organismo	Clorexidina 0,12%	
S. aureus	$20.0 \pm 0$	
MRSA	$20,5 \pm 0,71$	
S. epidermidis	$24,5 \pm 0,71$	
E. coli	$18,5 \pm 0,71$	
P. aeruginosa	$17.3 \pm 0.35$	
C. albicans	$10,5 \pm 0,71$	
S. mutans	$23,0 \pm 0$	
E. faecalis	27,0 ± 1,41	

## 4.3.2. Atividade antibacteriana in vitro dos sistemas contendo CCP

O sistema de FC (40/60) inicialmente avaliado, contendo 0,05% de CCP, não foi capaz de inibir o crescimento microbiano. No entanto, a solução de CCP usada como controle apresentou atividade microbiana e os dados estão indicados na Tabela VII.

**Tabela VII:** Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) ± desvio padrão obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas contendo CCP em diferentes concentrações à partir da FC e da solução aquosa.

	Concentração de CCP							
Micro-organismo	0,05%		2,5%		5,0%			
	Solução	FC	Solução	FC	Solução	FC		
S. aureus	11,0±0	0	15,0±5,84	0	15,0±5,96	0		
MRSA	10,0±0	0	11,5±0,71	0	13,0±0	0		
S.epidermidis	13,0±0	0	NR	NR	NR	NR		
E. coli	8,0±0	0	NR	NR	NR	NR		
E.faecalis	$9,0\pm0$	0	NR	NR	NR	NR		
C. albicans	7,5±0,71	0	NR	NR	NR	NR		
S. mutans	NR	NR	10,0±0,0	0	11,0±1,41	0		

NR: não realizado

Inicialmente imaginou-se que a concentração de CCP presente na formulação, (0,05%), era muito pequena para promover a inibição eficaz do crescimento microbiano. Esta concentração foi escolhida baseada na concentração usual de CCP em enxaquatórios bucais. No entanto, os resultados indicaram que seria necessário concentrações maiores para atividade

antimicrobiana eficaz. Estudos de desenvolvimento de sistemas de liberação lenta de CCP sugerem concentrações que variam de 2,5 à 10,0% para aplicação bucal. Al-Musallam et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de uma adesivo ortodôntico contendo CCP (2,5%, 5,0% e 10,0% p/p) contra *Streptococcus mutans*. E Ali et al. (2002) desenvolveram um disco bucoadesivo erodível usando diferentes polímeros bioadesivos contendo CCP na concentração de 2,5% (p/p) e avaliou sua atividade antimicrobiana contra *Candida albicans, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*. Em vista disso, foi decidido aumentar a concentração de CCP nos sistemas para 2,5% e 5,0% (AL-MUSALLAM et al, 2006; ALI et al, 2002). No entanto, também não foi observada inibição do crescimento microbiano pelo CCP à partir da FC (Tabela VII).

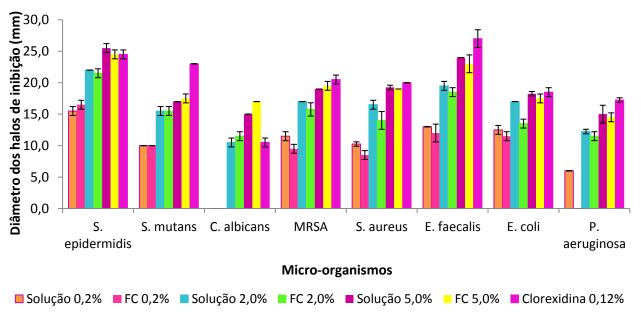
#### 4.3.3. Atividade antimicrobiana in vitro dos sistemas contendo PHMB

Foi avaliada a atividade antimicrobiana para os sistemas de FC (40/60) contendo PHMB nas concentrações de 0,2%, 2,0% e 5,0% (p/p) e os resultados para os halos de inibição estão representados na Figura 22 e na Tabela VIII.

**Tabela VIII:** Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) ± desvio padrão para os sistemas líquido-cristalinos de FC (40/60) e solução aquosa contendo PHMB em diferentes concentrações.

	Concentração de PHMB								
Micro-organismo	0,2	2%	2,0	0%	5,0%				
	Solução	FC	Solução	FC	Solução	FC			
S. aureus	10,3±0,35	8,5±0,71	16,5±0,71	14,0±1,41	19,3±0,35	19,0±0			
MRSA	11,5±0,71	9,5±0,71	17,0±0	15,8±1,06	19,0±0	19,5±0,71			
S. epidermidis	15,5±0,71	16,5±0,71	22,0±0	21,5±0,71	25,5±0,71	24,5±0,71			
E. coli	12,5±0,71	11,5±0	17,0±0	13,5±0,71	18,3±0,35	17,5±0,71			
P. aeruginosa	6,0±0	0	12,3±0,35	11,5±0,71	15,0±1,41	14,5±0,71			
E. faecalis	13,0 ±0	12,0±1,41	19,5±0,71	18,5±0,71	24,0±0	23,0±1,41			
C. albicans	0	0	10,5±0,71	11,5±0,71	15,0±0	17,0±0			
S. mutans	10,0±0	10,0±0	15,5±0,71	15,5±0,71	17,0±0	17,5±0,71			

**Figura 22:** Média do diâmetro dos halos de inibição (mm) ± desvio padrão para os sitemas líquido-cristalinos e solução aquosa em função da concentração de PHMB e micro-organismos, (n=2).

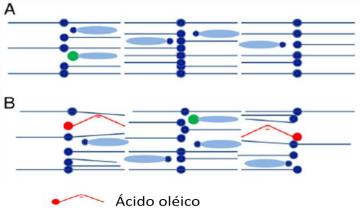


Foi observado inibição do crescimento dos micro-organismos em todas as concentrações testadas e a atividade antimicrobiana *in vitro* aumentou com o aumento da concentração do PHMB de 0,2 à 5,0% (P<0.001).

Era esperado que os sistemas líquido-cristalinos apresentassem menores halos de inibição comparados às soluções controle, uma vez que promovem controlada do fármaco. No entanto, apresentaram antimicrobiana semelhante às soluções, com exceção para a P. aeruginosa, onde a FC à 0,2 % não inibiu o crescimento do micro-organismo. Uma possível explicação para este resultado é a hipótese de que a MO esteja exercendo um efeito sinérgico na atividade antibacteriana do PHMB, devido às suas propriedades de promotor da absorção (HERAI et al., 2007; KWON et al., 2012). A MO provoca uma desorganização temporária e reversível na estrutura lamelar organizada das bicamadas do estrato córneo, aumentando a fluidez no espaço lipídico intercelular. Como a MO tem uma estrutura similar ao ácido oléico, com uma dupla ligação cis-insaturada na molécula, sugere-se que a MO interage com as bicamadas lipídicas, com efeito de promoção da permeação de forma similar ao ácido oléico (AO), aumentando a permeabilidade das bicamadas lipídicas (HERAI et al., 2007; SIMONETTI et al., 2009). Devido à sua estrutura química,

após a introdução da insaturação nas cadeias lipídicas do estrato córneo, a ligação dupla do AO afeta o arranjo molecular das cadeias alquil lipídicas e, consequentemente, todo o arranjo da bicamada lipídica, deixando-as mais afastadas, como representado na Figura 23 (ENGELBRECHT et al, 2011). Da mesma forma, a MO pode ser capaz de desorganizar a bicamada lipídica da membrana dos micro-organismos. É relatado na literatura que o mecanismo de ação do PHMB se baseia na atração eletrostática entre suas moléculas positivas e a membrana negativamente carregada do micro-organismo, promovendo a perda de integridade da membrana. Além disso, o PHMB também é transferido para o citoplasma, inibindo o metabolismo do micro-organismo (HUBNER & KRAMER et al., 2010). Desta forma, o possível efeito da MO na membrana dos micro-organismos estaria facilitando a entrada do PHMB para o interior da célula, e desta forma, aumentando o efeito antimicrobiano. Ou então, a MO diminui a integridade da membrana celular apenas devido à sua interação com as bicamadas lipídicas, aumentando o efeito do PHMB nas membranas celulares.

**Figura 23:** Esquema do efeito promotor de absorção do ácido oléico nas bicamadas lipídicas do estrato córneo: A) Bicamada lipídica intacta; B) Bicamada lipídica após introdução do ácido oléico.



Fonte: ENGELBRECHT et al, 2011

Cada micro-organismo apresentou uma sensibilidade diferente ao PHMB. Para a *C. albicans*, nem a solução nem o sistema de FC contendo 0,2% (p/p) de PHMB foram capazes de inibir o crescimento desse micro-organismo nas condições analisadas. O *S. epidermidis* apresentou maior sensibilidade frente ao PHMB, em todas as concentrações para o sistema de FC avaliado. Em contraste,

os micro-organismos *C. albicans* e *P. aeruginosa*, foram os mais resistentes, apresentando a mesma sensibilidade, já que não foi encontrada diferença estatística entre seus halos de inibição. Isto sugere que o PHMB tem uma maior atividade bacteriostática contra bactérias gram-positivas, que foram as espécies mais sensíveis no teste.

Foram obtidos halos de inibição semelhantes entre a FC contendo 5.0% de PHMB e a solução de clorexidina na concentração de 0,12% para os microorganismos S. aureus, MRSA, S. epidermidis e E.coli. Para a P. aeruginosa e o S. mutans o halo de inibição obtido para a FC contendo PHMB foi inferior em todas as concentrações. No entanto, para a *C. albicans*, a FC contendo 2,0% de PHMB gerou um halo de inibição um pouco maior que a solução de clorexidina na concentração de 0,12%. Nascimento et al. (2008), também encontraram maior atividade antimicrobiana para uma solução contendo 0,12% de clorexidina comparada com uma solução contendo 0,35% de PHMB ao avaliar a diluição máxima inibitória contra o Staphilococcus aureus. Em um estudo realizado por Rosin et al. (2001) também foi observado maior atividade antibacteriana para uma solução contendo 0,12% de clorexidina comparada com um antisséptico bucal contendo 0,04% de PHMB. No entanto, neste estudo Rosin et al. (2001) concluiu que o PHMB na concentração de 0,04% foi efetivo em inibir o crescimento do biofilme e em reduzir a contagem bacteriana na boca, e pode ser usado para prevenção de infecções da boca.

Além disso, não existem relatos na literatura sobre um diâmetro ideal do halo de inibição para que se tenha uma adequada atividade antimicrobiana *in vivo* e, como destacado anteriormente, esta metodologia é apenas para avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana. Além disso, deve-se desenvolver novos sistemas de liberação de fármacos a fim de melhorar a eficiência da terapia, aumentando os benefícios para o paciente e reduzindo seus efeitos adversos. A FC é um sistema de liberação lenta, logo, este resultado para o PHMB é após 2 horas de liberação apenas (tempo da pré-incubação). Como este sistema permite um tempo maior de contato da formulação no local de aplicação, é possível manter este efeito inibitório por um tempo maior que as formulações comuns, além de diminuir os efeitos adversos.

#### 4.3.4. Atividade antimicrobiana in vitro dos sistemas contendo Triclosan®

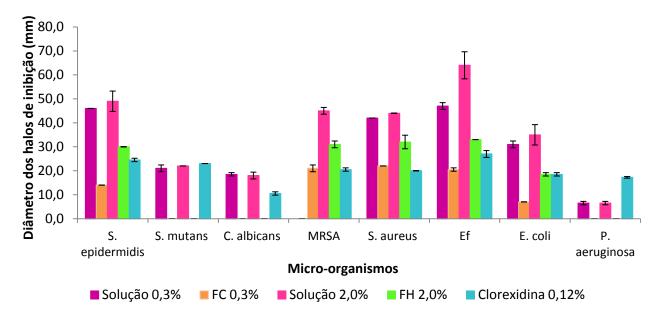
Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos sistemas de FC e FH, ambos na proporção de água/MO de 40/60, contendo 0,3% e 2,0% (p/p) de Triclosan<sup>®</sup>, respectivamente. A solução alcoólica do Triclosan<sup>®</sup>, nas mesmas concentrações, também foi avaliada e usada como controle. Como o Triclosan<sup>®</sup> é apolar, foi necessário sua solubilização em uma solução alcoólica à 40% em água. Desta forma, também foi avaliada a atividade antimicrobiana da solução alcoólica na concentração de 40,0% (v/v) sem adição do fármaco. E usando a metodologia do poço-difusão em ágar, o álcool evapora e, por isso, não foi observada formação do halo de inibição. A Tabela IX e Figura 24 mostram os resultados obtidos para os halos de inibição para os sistemas avaliados.

**Tabela IX:** Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) ± desvio padrão para os sistemas líquido-cristalinos de FC, FH (40/60) e solução alcoólica 40,0% (v/v) contendo Triclosan<sup>®</sup> em diferentes concentrações.

Micro-organismo	Triclos	san <sup>®</sup> 0,3%	Triclosan <sup>®</sup> 2,0%		
Wilcro-organismo	Solução	Solução FC		FH	
S. aureus	42,0±0	22,0±0	44,0±0	32,0±2,83	
MRSA	ND	21,0±1,41	45,0±1,41	31,0±1,41	
S. epidermidis	46,0±0	14,0±0	49,0±4,24	30,0±4,24	
E. coli	31,0±1,41	7,0±0	35,5±4,24	18,5±0,71	
P. aeruginosa	6,5±0,71	0	6,5±0,71	0	
E. faecalis	47,0 ±1,41	20,5±0,71	64,0±5,65	33,0±0	
C. albicans	18,5±0,71	0	18,5±1,41	0	
S. mutans	21,0±1,41	0	22,0±0	0	

ND: não determinado

**Figura 24:** Média do diâmetro dos halos de inibição (mm) ± desvio padrão para os sistemas líquido-cristalinos de FC (40/60) e solução alcoólica em função da concentração de Triclosan<sup>®</sup> e micro-organismos, (n=2).



Foi observado que, exceto para *P. aeruginosa, C. albicans* e *S. mutans*, os sistemas de FC e FH contendo Triclosan<sup>®</sup> apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados. Já as soluções apresentaram atividade antimicrobiana para todos os micro-organismos. Como estes micro-organismos estão muito associados com infecções bucais, é necessário aumentar a sua concentração nos sistemas líquido-cristalinos para que seja obtido melhor atividade antimicrobiana. Ao contrário, foi observado grande sensibilidade do gênero *Staphilococcus* (*S. aureus, MRSA* e *S. epidermides*), que são micro-organismos transientes na boca, no entanto, mais associados com infecções tópicas.

Os halos de inibição médio obtidos para o Triclosan liberados à partir dos sistemas líquido-cristalinos não foram iguais aos halos de inibição obtidos para o fármaco em solução (p<0,001), ao contrário do que foi observado para o PHMB, discutido no item anterior. Este resultado pode ser explicado pela propriedade lipofílica do Triclosan<sup>®</sup>, que facilmente atravessa a membrana das células microbianas, ao contrário do PHMB. Desta forma, o possível efeito da MO na membrana da célula não aumentaria a atividade do Triclosan<sup>®</sup>, uma vez que atravessar a membrana celular não é um passo limitante para sua atividade

antimicrobiana. E uma vez dentro da célula, o Triclosan<sup>®</sup> inibe a ação da enzima responsável pela síntese dos ácidos graxos, componentes da membrana celular, promovendo morte celular (HOQ & IBRAHIM, 2011).

Outro aspecto relevante é que não foi observada diferença significativa entre os halos de inibição das soluções quando a concentração foi aumentada de 0,3% para 2,0% (p/p) de Triclosan®, exceto para o micro-organismo *E. faecalis* (p<0,01). Mas quando aumentada a concentração de 0,3% para 2,0% nos sistemas líquido-cristalinos, foi observado aumento significativo dos halos de inibição para os micro-organismos S. epidermidis (p <0,01), MRSA (p<0,01), S. aureus (p<0,01), E. faecalis (p<0,05) e E. coli (p<0,05).

O micro-organismo mais resistente ao Triclosan<sup>®</sup> foi a *P. aeruginosa*. Este resultado já era esperado uma vez que esta bactéria possui resistência intrínseca para este fármaco. Estudos recentes mostraram que a *P. aeruginosa* contem duas enoil-ACP-redutase, conhecidas como Fabl e FabK, ambas resistentes ao Triclosan<sup>®</sup> (HAMUD-SOCORO, 2004).

O Triclosan<sup>®</sup> apresentou halos de inibição igual ao da solução de clorexidina na concentração de 0,12% para os micro-organismos *S. epidermides* e *E. coli* na concentração de 2,0% de Triclosan<sup>®</sup>; MRSA e *S. aureus* na concentração de 0,3% de Triclosan<sup>®</sup> e E. faecalis em ambas as concentrações de Triclosan<sup>®</sup>. Para os demais micro-organismos, *C. albicans, P.aeruginosa* e *S. mutans*, os sistemas líquido-cristalinos de FC e FH contendo Triclosan<sup>®</sup> não apresentaram atividade antimicrobiana.

# 4.4. Validação da metodologia de quantificação do CCP, Triclosan® e PHMB

## 4.4.1. Validação da metodologia de quantificação do CCP

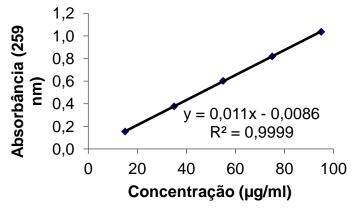
A curva padrão média obtida em presença de tampão fosfato isotônico pH 7,4 está apresentada na Figura 25 de acordo com os resultados apresentados na Tabela X, e, como pode ser observado pelo valor do coeficiente de correlação (r), o método apresentou linearidade.

**Tabela X:** Média dos valores de absorbância obtidos para cada concentração e desvio padrão da curva padrão média de CCP em tampão fosfato pH 7,4.

Concentração (µg/mL)	Absorbância (259nm)	Desvio Padrão	
15	0,155	0,0149	
35	0,377	0,0091	
55	0,602	0,0157	
75	0,819	0,0204	
95	1,036	0,0121	

Os valores apresentados representam a média de 5 determinações.

**Figura 25:** Curva padrão média do CCP em solução tampão fosfato isotônico pH 7,4.



A Tabela XI apresenta valores de desvio padrão relativo intra-corrida e intercorridas (precisão), assim como os valores de exatidão intra-corridas e intercorridas calculados nas concentrações estudadas.

**Tabela XI:** Resultados obtidos nos parâmetros precisão e exatidão para o CCP.

Concentração	DPR Intra-	DPR Inter-	Exatidão Intra-	Exatidão Inter-
(µg/mL)	corrida	corrida	corrida (%)	corridas (%)
15	4,1830	3,7332	105,668	98,902
55	1,2372	2,3318	101,358	101,165
95	0,8491	0,6783	99,942	100,127

Os valores de desvio padrão relativo encontrados foram menores que 5% e, por isso, considerados satisfatórios. Os valores encontrados para a exatidão foram muito próximos a 100%, mostrando a alta confiabilidade do método.

Os parâmetros limite de detecção e limite de quantificação foram obtidos e seus resultados são, respectivamente, 0,4845 µg/mL e 1,6149 µg/mL.

#### 4.4.2. Validação da metodologia de quantificação do Triclosan®

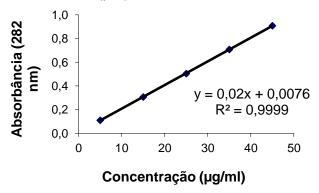
A curva padrão média obtida em presença de tampão fosfato isotônico pH 7,4 com adição de 2,0% (p/p) de Tween 20 está apresentada na Figura 26 de acordo com os resultados apresentados na Tabela XII, e, como pode ser observado pelo valor do coeficiente de correlação (r), o método apresentou linearidade.

**Tabela XII:** Média dos valores de absorbância obtidos para cada concentração e desvio padrão da curva padrão média de Triclosan<sup>®</sup> em tampão fosfato isotônico pH 7,4 com adição de 2,0% (p/p) de Tween 20.

Concentração (µg/mL)	Absorbância (282 nm)	Desvio Padrão	
5	0,110	0,0099	
15	0,306	0,0049	
25	0,504	0,0080	
35	0,708	0,0116	
45	0,908	0,0152	

Os valores apresentados representam a média de 5 determinações.

**Figura 26:** Curva padrão média do Triclosan<sup>®</sup> em solução tampão fosfato pH 7,4 contendo Tween 20 a 2% (p/v).



A Tabela XIII apresenta valores de desvio padrão relativo intra-corrida e inter-corridas (precisão), assim como os valores de exatidão intra-corridas e inter-corridas calculados nas concentrações estudadas.

Tabela	XIII:	Resultados	obtidos	nos	parâmetros	precisão	е	exatidão	para	0
Triclosa					•	•			•	

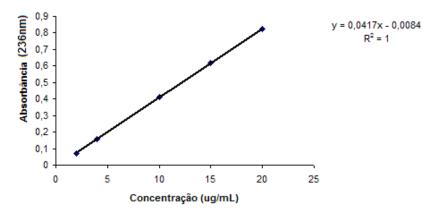
Concentração (µg/mL)	DPR Intra- corrida	DPR Inter- corrida	Exatidão Intra- corrida (%)	Exatidão Inter- corridas (%)
5	2,0327	4,9799	102,800	104,386
25	1,4441	2,1599	102,520	101,284
45	0,0484	1,9668	102,578	102,107

Os valores encontrados para o DPR e para a Exatidão foram considerados satisfatórios (menores que 5% e muito próximos a 100%, respectivamente) mostrando a alta confiabilidade do método. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram, respectivamente, 0,4290 µg/mL e 1,4298 µg/mL.

### 4.4.3. Validação da metodologia de quantificação do PHMB

A curva padrão média obtida em presença de tampão fosfato isotônico pH 7,4 está apresentada na Figura 27, e como pode ser observado pelo valor do coeficiente de correlação (r), o método apresentou linearidade.

**Figura 27:** Curva padrão média do PHMB em solução tampão fosfato isotônico pH 7,4.



A Tabela XIV apresenta valores de desvio padrão relativo intra-corrida e inter-corridas (precisão), assim como os valores de exatidão intra-corridas e inter-corridas calculados nas concentrações estudadas.

**Tabela XIV:** Resultados obtidos nos parâmetros precisão e exatidão para o PHMB.

Concentração (μg/mL)	DPR Intra-corrida	DPR Inter-corrida	Exatidão
4	1,78	3,18	100,75
10	0,76	3,74	100,5
20	1,13	3,94	99,85

Os valores de desvio padrão relativo encontrados foram menores que 5% e, por isso, considerados satisfatórios. Os valores encontrados para a exatidão foram muito próximos a 100%, mostrando a alta confiabilidade do método.

Os parâmetros limite de detecção e limite de quantificação foram obtidos e seus resultados são, respectivamente, 0,1488 µg/mL e 0,4959 µg/mL.

## 4.5. Estudo do perfil de liberação in vitro dos fármacos estudados

#### 4.5.1. Avaliação do perfil de liberação in vitro dos sistemas contendo CCP

#### 4.5.1.1. Estudo do perfil de liberação in vitro

Os sistemas contendo CCP foram escolhidos inicialmente para a realização dos estudos de liberação. A solubilidade do fármaco na solução receptora foi avaliada, correspondendo à 324,82 ug/mL, garantindo as condições *sink* no estudo realizado.

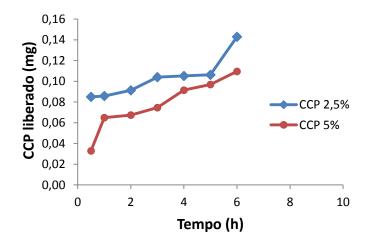
No estudo do perfil de liberação do sistema de FC contendo CCP na concentração de 0,05%, foi liberada quantidade muito pequena do fármaco (dados não mostrados), o que pode justificar a ausência de atividade antimicrobiana (Item 4.3.2.). Por isso foram realizados novos estudos com o sistema de FL contendo 2,5% e 5,0% de CCP. Estes estudos foram realizados apenas com a FL, uma vez que este sistema apresentou melhores resultados na avaliação das propriedades mucoadesivas, como será discutido posteriormente no Item 4.6.. No entanto, também foi liberada quantidade muito pequena do

fármaco (Tabela XV). Os mesmos resultados estão indicados na Figura 28, expressos em porcentagem de CCP liberado.

**Tabela XV:** Quantidade de fármaco liberado (mg) ± desvio padrão de sistema líquido-cristalino de FL contendo CCP em diferentes concentrações usando membrana de acetato de celulose e tampão fosfato isotônico pH 7,4 como solução receptora (n=3).

Tempo de	Concentração de CCP na FL		
liberação	2,5%	5,0%	
0,5 h	$0.09 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.03$	
1h	$0.09 \pm 0.01$	$0.06 \pm 0.06$	
2h	$0.09 \pm 0.02$	$0.07 \pm 0.08$	
3h	$0,10 \pm 0,05$	$0.07 \pm 0.09$	
4h	$0,11 \pm 0,03$	$0.09 \pm 0.11$	
5h	$0,11 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,12$	
6h	$0,14 \pm 0,05$	$0,11 \pm 0,14$	
24h	$0,48 \pm 0,39$	$0.30 \pm 0.35$	

**Figura 28:** Perfil de liberação de sistema líquido-cristalino de FL contendo CCP na concentração de 2,5% e 5,0% (p/p) usando membrana de acetato de celulose e tampão fosfato isotônico pH 7,4 como solução receptora. (n=3)



A baixa liberação do CCP à partir do sistema líquido-cristalino poderia ser devido à três fatores: o próprio sistema não estaria liberando o fármaco para o meio de dissolução; a membrana utilizada no estudo de liberação *in vitro* não estaria permitindo a passagem do fármaco para o meio de dissolução; ou ainda, a degradação ou erosão do sistema estaria liberando MO e esta, por sua vez,

alcançando a solução receptora e prejudicando a quantificação do CCP por espectrofotometria.

## 4.5.1.2. Avaliação da membrana utilizada no estudo de liberação in vitro

Para verificar se a causa da baixa liberação era a membrana de acetato de celulose até então utilizada nos ensaios, avaliou-se diferentes membranas: acetato de celulose, poliéster sulfona, éster de celulose e nitrato de celulose, através do estudo de recuperação do CCP por 24 horas. Os resultados da quantidade de CCP liberada (mg) para cada membrana está representado na Tabela XVI. Este estudo mostrou uma recuperação muito pequena do CCP com a membrana de acetato de celulose (2,64%) e nos permitiu selecionar a membrana de éster de celulose como adequada para os estudos posteriores de liberação, pois permitiu uma recuperação de 81,66% do CCP na solução receptora. No entanto, foi liberada quantidade muito pequena do CCP à partir da FL após ensaio de liberação até 24 horas usando esta membrana. Logo, conclui-se que a membrana utilizada nos estudos de liberação *in vitro* não era a responsável pela baixa liberação do CCP.

**Tabela XVI:** Quantidade de fármaco liberado (mg) após 24 horas de ensaio à partir de uma solução aquosa contendo 5,0% (p/p) de CCP em tampão fosfato isotônico pH 7,4 usando diferentes membranas.

Membrana teste	Quantidade de CCP liberado (mg)
Poliéstersulfona	50,12
Éster de celulose	40,83
Acetato de celulose	1,32
Nitrato de celulose	44,72

# 4.5.1.3. Avaliação da interferência da MO no método de quantificação do CCP

Outra hipótese seria uma possível degradação do sistema líquido-cristalino durante o estudo de liberação *in vitro*, liberando MO. Considerando que a MO liberada estivesse atravessando a membrana utilizada nos estudos de liberação *in* 

vitro e alcançando a solução receptora, a sua possível interferência na quantificação do fármaco foi avaliada. Para tanto, efetuou-se a quantificação de uma solução de CCP, com concentração inicial conhecida igual a 35,0 µg/mL, após 24 horas de contato com o sistema de FC sem adição do fármaco, usando membrana de acetato de celulose. A concentração do CCP quantificada por espectrofotometria após 30 minutos e 24 horas de contato foi de 34,09 µg/mL e 33,80 µg/mL, respectivamente. De acordo com os resultados, verificou-se que a concentração da solução de CCP manteve-se praticamente inalterada na solução receptora após 24 horas de contato com a FC. Portanto, conclui-se que, se a MO estiver alcançando a solução receptora, ela não está interferindo na quantificação do CCP, uma vez que a concentração final de CCP na solução receptora manteve-se constante. Logo, a metodologia não é a causa da baixa quantificação do fármaco e a MO não está interferindo na quantificação do CCP. Além disso, não foi observado degradação do sistema ao final desse estudo, nem dos estudos de liberação in vitro (Item 4.5.1.1.). E é importante lembrar que a FC contendo diferentes concentrações de CCP também não apresentou atividade antimicrobiana in vitro (Item 4.3.2.), reforçando os resultados de que o fármaco não está sendo liberado do sistema.

### 4.5.1.4. Estudo da absorção do CCP em MO

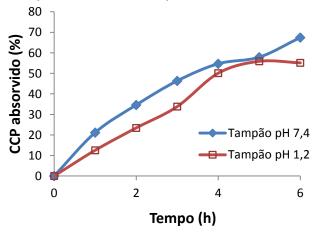
Um estudo de absorção do fármaco em MO foi realizado para observar se esta era a causa da liberação incompleta do CCP, uma vez que a formação de pares de íons insolúveis entre os ácidos graxos presentes na MO e na molécula de fármacos catiônicos, como o CCP, pode estar relacionado com a liberação sustentada e incompleta do fármaco (CHANG, 1995). Neste sentido, para investigar se a liberação incompleta do CCP foi devido à interação iônica entre as moléculas catiônicas do fármaco e os ácidos graxos livres ionizados dos monoglicerídeos, a absorção do CCP em MO pura foi investigada. De acordo com dados representados na Tabela XVII, observa-se que o CCP foi fortemente absorvido pela MO, sendo que após 6 horas de contato, 67,46% do fármaco já havia sido absorvido (Figura 29). Portanto, a partir destes resultados, conclui-se que a afinidade das moléculas de CCP pela mesofase de monoglicerídeos limitou

a quantidade de fármaco liberada. Outros fármacos catiônicos, furosemida e cloridrato de propranolol, também foram absorvidos em MO em pH elevado, provocando baixa liberação destes fármacos nos sistemas avaliados, devido à complexação dos fármacos com as cargas oposta dos monoglicerídeos (CHANG & BODMEIER, 1997a; SALLAN et al., 2002).

**Tabela XVII:** Quantidade de CCP absorvido em MO à partir de uma solução em tampão fosfato isotônico pH 7,4 e tampão de HCL 0,2M pH 1,2.

Tempo de contato -	Quantidade de CCP absorvido (mg)		
rempo de contato -	pH 7,4	pH 1,2	
1h	20,31	12,04	
2h	33,22	22,49	
3h	44,49	32,49	
4h	52,49	48,13	
5h	55,58	53,67	
6h	64,76	52,95	

**Figura 29:** Absorção do CCP em MO à partir de uma solução em tampão fosfato isotônico pH 7,4 e tampão de HCl 0,2M pH 1,2.



Segundo Chang & Bodmeier (1997a), como o pH do meio afeta o grau de ionização dos ácidos graxos livres nos monoglicerídeos e a formação da mesofase, a absorção do fármaco na MO pode ser influenciada pelo pH. Por isso a absorção do fármaco também foi avaliada em tampão de HCl 0,2 M pH 1,2. Neste caso, foi observado que 55,15% do fármaco foi absorvido pela MO após 6 horas de contato, indicando que mesmo em pH baixo o CCP não seria liberado (Figura 29).

#### 4.5.2. Estudo do perfil de liberação in vitro dos sistemas contendo PHMB

A habilidade dos sistemas líquido-cristalinos mucoadesivos em liberar quantidades de PHMB por um longo período de tempo é uma importante característica para benefícios clínicos. As tabelas XVIII e IXX representam a quantidade (mg) de PHMB liberado à partir da FL e da FC, respectivamente, e a Figura 30 apresenta a porcentagem de PHMB liberado à partir dos sistemas líquido-cristalinos de FC e FL em diferentes concentrações e de uma solução controle à 2,0% (p/p) para verificar o efeito dos sistemas líquido-cristalinos em alterar a liberação do fármaco.

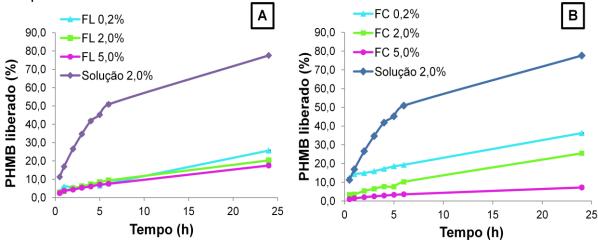
**Tabela XVIII:** Quantidade de fármaco liberado (mg) ± desvio padrão para os sistema líquido-cristalino de MO/água de FL contendo PHMB em diferentes concentrações e da solução aquosa à 2,0% (p/p), usando tampão fosfato pH 7,4 como solução receptora.

Tempo de	Concentração de PHMB na FL			
liberação	0,2%	2,0%	5,0%	Solução 2,0%
30 min	$0.06 \pm 0.08$	$0,57 \pm 0,08$	1,23 ± 0,06	2,25 ± 0,42
1h	$0,12 \pm 0,03$	$0.71 \pm 0.08$	$1,84 \pm 0,17$	$3,38 \pm 0,51$
2h	$0,11 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,08$	$2,17 \pm 0,12$	$5,31 \pm 0,69$
3h	$0,12 \pm 0,03$	$1,23 \pm 0,10$	$2,68 \pm 0,14$	$6,94 \pm 0,86$
4h	$0,15 \pm 0,03$	$1,44 \pm 0,13$	$3,03 \pm 0,18$	$8,36 \pm 0,85$
5h	$0,13 \pm 0,03$	$1,68 \pm 0,13$	$3,53 \pm 0,23$	$9,04 \pm 0,70$
6h	$0,15 \pm 0,05$	1,87 ±0,15	$3,76 \pm 0,30$	10,18 ±0,94
24h	$0,51 \pm 0,28$	$4,06 \pm 0,38$	$8,76 \pm 1,01$	15,52 ±0,49

**Tabela XIX:** Quantidade de fármaco liberado (mg) ± desvio padrão para os sistema líquido-cristalino de MO/água de FC contendo PHMB em diferentes concentrações e da solução aquosa à 2,0% (p/p), usando tampão fosfato pH 7,4 como solução receptora.

Tempo de		Concentração (	Concentração de PHMB na FC	
liberação	0,2%	2,0%	5,0%	Solução 2,0%
30 min	$0,25 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,10$	$0,51 \pm 0,04$	2,25 ± 0,42
1h	$0,29 \pm 0,04$	$0.83 \pm 0.12$	$0,72 \pm 0,04$	$3,38 \pm 0,51$
2h	$0.30 \pm 0.05$	$1,08 \pm 0,11$	$1,02 \pm 0,05$	$5,31 \pm 0,70$
3h	$0.32 \pm 0.06$	$1,30 \pm 0,13$	$1,26 \pm 0,03$	$6,94 \pm 0,86$
4h	$0.34 \pm 0.06$	$1,55 \pm 0,15$	$1,45 \pm 0,11$	$8,36 \pm 0,85$
5h	$0.37 \pm 0.06$	$1,78 \pm 0,21$	$1,65 \pm 0,06$	$9,04 \pm 0,70$
6h	$0.39 \pm 0.07$	$2,05 \pm 0,23$	$1,80 \pm 0,10$	10,18 ±0,94
24h	$0,72 \pm 0,12$	$5,09 \pm 0,83$	$3,63 \pm 0,28$	15,52 ±0,49

**Figura 30:** Perfil de liberação *in vitro* para sistema líquido-cristalino de A) FL e B) FC contendo PHMB em diferentes concentrações e para solução aquosa contendo 2,0% (p/p) de PHMB usando tampão fosfato pH 7,4 como solução receptora.



Pode-se observar que o teor inicial de água nos sistemas líquido-cristalinos de MO/água não está influenciando na liberação do fármaco. Isto porque a FL se transforma rapidamente em FC e a liberação ocorre a partir da FC (BURROWS et al., 1994; GERAGHTY et al., 1996). No entanto, foi observado que a FC contendo 5,0% de PHMB apresentou uma porcentagem de fármaco liberado muito menor quando comparado com a FL, na mesma concentração. Este resultado pode ser explicado pela influência que o fármaco exerce no comportamento de fases do sistema quando em altas concentrações. Sendo um fármaco hidrofílico, a formação da FL é favorecida, desta forma a transição para a FC durante o ensaio

de liberação, ocorreu mais lentamente. Desta forma a liberação se deu à partir da FL e, sabendo que a liberação é mais rápida à partir dessa fase, obteve-se uma liberação maior do fármaco. Na presença de excesso de água, a MO absorverá água suficiente para formar a FC (ENGSTROM et al., 1988). Um fármaco incorporado em um sistema líquido-cristalino de MO/água deve, portanto, sempre ser liberado da FC (ENGSTROM et al., 1989). No entanto, se o fármaco incorporado modificar o comportamento de fase do sistema, então a FC pode não ser necessariamente formada em excesso de água. Qualquer modificação no tipo de fase formada pode causar alterações na quantidade de fármaco incorporada no sistema líquido-cristalino e em seu sítio de incorporação (BURROWS et al., 1994).

A liberação de fármacos em função do conteúdo inicial de água de sistemas líquido-cristalinos tem sido descrita por outros autores, no entanto os resultados entre os vários estudos são conflitantes (LARA et al., 2005; BURROWS et al., 1994; LEE et al., 2003; KUMAR et al., 2004; RIZWAN et al, 2009). Alguns autores relatam um aumento na liberação do fármaco com aumento do conteúdo inicial de água, devido ao aumento da espessura dos canais de água hidrofílicos na estrutura bicontínua disponíveis para a liberação do fármaco, aumentando, portando, a sua liberação (CHANG & BODMEIER, 1997a; LEE & KELLAWAY, 2000b; COSTA-BALOGH et al., 2010). Outros têm encontrado que não há diferença na taxa de liberação em função do conteúdo inicial de água de sistemas líquido-cristalinos devido à rápida formação da FC (BURROWS et al., 1994; GERAGHTY et al., 1996). Chang e Bodmeier (1997) relataram um aumento na liberação do fármaco com aumento do conteúdo inicial de água, resultado similar foi observado por Lee e Kellaway (2000a), que encontraram uma melhor liberação em amostras completamente hidratadas inicialmente. Estes resultados podem ser atribuídos, provavelmente, ao aumento da espessura dos canais de água hidrofílicos na estrutura bicontínua disponíveis para a liberação do fármaco com o aumento do conteúdo inicial de água, aumentando, portando, a liberação do fármaco (COSTA-BALOGH et al., 2010). Estas diferenças nos resultados sobre a influência do conteúdo inicial de água no perfil de liberação para diferentes fármacos estudados podem estar relacionados com a partição do fármaco entre a fase oleosa (MO) e a aquosa. Carr et al. (1997) relatou que um aumento no conteúdo de água do veículo aumenta o coeficiente de difusão aparente de fármacos que apresentam uma partição significativa na fase oleosa, enquanto que para fármacos que não particionam nesta fase, o coeficiente de partição aparente diminui. No primeiro caso, o aumento no conteúdo inicial de água diminuiria a concentração na fase oleosa, e então aumentaria a liberação. Para fármacos sem nenhuma afinidade pela MO o aumento no conteúdo de água simplesmente reduziria a concentração do fármaco, resultando na redução da liberação.

Comparando o efeito da concentração do fármaco no perfil de liberação, foi verificado que em baixas concentrações os sistemas apresentam semelhantes porcentagens de liberação. No entanto, a concentração de 5,0% de PHMB a presença do fármaco está influenciando no perfil de liberação (Figura 30). Este resultado pode estar relacionado com os resultados do intumescimento das amostras, que demonstraram que à concentração de 5,0% de PHMB o intumescimento dos sistemas foi muito maior. Consequentemente, o caminho de difusão aumentou, diminuindo a taxa de liberação nesta concentração. Segundo Norling et al. (1992) e Burrows et al. (1994) tanto a concentração inicial quanto a solubilidade do fármaco incorporado nos sistemas de MO/água podem influenciar no perfil de liberação. No entanto, o efeito da concentração do fármaco no perfil de liberação depende também da partição do fármaco entre a fase oleosa e aquosa (KUMAR et al., 2004; SHAH et al., 2001).

O comportamento de liberação de um fármaco a partir de sistemas líquidocristalinos está relacionado com muitos aspectos, como as propriedades e
concentração do fármaco incorporado, teor inicial de água, tipo de mesofase
formada, capacidade de intumescimento, interação eletrostática entre o fármaco e
a bicamada lipídica, entre outros (GUO et al., 2010). Para fármacos hidrofílicos, a
liberação do sistema é controlada pela difusão através dos canais aquosos, sendo
afetada por alterações de temperatura e propriedades do lipídeo, enquanto a
liberação de fármacos lipofílicos depende também do seu coeficiente de partição,
bem como de sua difusão através dos canais de água (PHAN et al., 2011). Parte
do controle da liberação é determinada pelo comportamento da fase lipídica, em
que a FL dá origem a uma liberação mais rápida do que a FC, com duração da
liberação dependente da propriedade do fármaco incorporado. A liberação do
fármaco incorporado parece ser controlada parcialmente pela microestrutura

característica destes sistemas, onde o fármaco difunde através dessa estrutura para alcançar o ambiente externo. Ainda, ocorre uma transição de fase para FC durante o ensaio de liberação devido a captação de água pelo sistema e isso pode influenciar a razão e mecanismo de liberação (COSTA-BALOGH et al, 2010; SHAH et al., 2001). O tamanho e tortuosidade do poro dos canais de água e a espessura e alta viscosidade da FC contribui para uma liberação sustentada do fármaco (RIZWAN et al., 2009).

#### 4.5.3. Estudo do perfil de liberação in vitro do Triclosan®

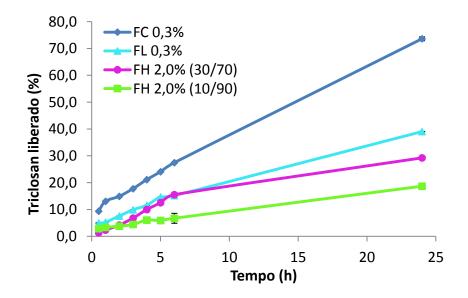
Os resultados obtidos para o perfil de liberação do Triclosan<sup>®</sup> nas concentrações de 0,3% e 2,0% a partir da FC, FL e FH estão representados na Figura 31 e indicados na Tabela XX. Não foi realizado o estudo do perfil de liberação do fármaco na concentração de 5,0% (p/p), uma vez que esta também se apresentou como FH.

Neste caso foi observado que o teor inicial de água está influenciando no perfil de liberação do fármaco, uma vez que foi liberada porcentagem maior do Triclosan® à partir da FC quando comparado com a FL. Além disso, a FH com teor inicial de água de 30% também liberou porcentagem maior que a mesma fase com teor inicial de 10%. Para fármacos lipofílicos, a liberação depende do seu coeficiente de partição, bem como da difusão através dos canais de água (PHAN et al., 2011). Fármacos lipofílicos estão localizados dentro das bicamadas lipídicas, portanto, sua partição dentro dos canais de água se torna o passo limitante da liberação (KUMAR et al., 2004). Como o Triclosan<sup>®</sup> é muito pouco solúvel em água, a quantidade de água menor para sua solubilização nos sistemas com menor teor inicial de água, justifica a menor liberação a partir da FL e da FH, uma vez que o fármaco deve primeiro ser solubilizado, para em seguida difundir pelos canais de água e alcançar o meio externo. Além disso, a incorporação de fármacos lipofílicos na bicamada lipídica reduz o volume de água nos canais aquoso, e a redução no conteúdo aquoso do sistema diminui a espessura dos canais de água da estrutura bicontínua e, portanto, diminui a velocidade de liberação do fármaco (COSTA-BALOGH et al., 2010; KUMAR et al., 2004).

**Tabela XX:** Quantidade de fármaco liberado (mg) ± desvio padrão à partir de sistema líquido-cristalino contendo Triclosan<sup>®</sup> em diferentes concentrações, usando tampão fosfato pH 7,4 com 2,0% (v/v) de Tween 20 como solução receptora.

Tempo de	0,3% de Triclosan®		2,0% de Triclosan®	
liberação	FL	FC	FH (10/90)	FH (30/70)
0,5 h	$0,15 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0$	$0,27 \pm 0,01$
1h	$0,16 \pm 0,04$	$0.39 \pm 0.01$	$0,67 \pm 1,03$	$0,47 \pm 0,01$
2h	$0,23 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,07$	$0,76 \pm 0,97$	$0.84 \pm 0.07$
3h	$0.30 \pm 0.04$	$0,53 \pm 0,11$	$0,89 \pm 0,16$	$1,36 \pm 0,09$
4h	$0.35 \pm 0.06$	$0,63 \pm 0,15$	1,21 ±0,13	$2,00 \pm 0,29$
5h	$0,44 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,19$	1,18 ±0,24	$2,51 \pm 0,46$
6h	$0,46 \pm 0,04$	$0.82 \pm 0.22$	1,35 ±1,85	$3,11 \pm 0,53$
24h	1,17 ±0,08	$2,21 \pm 0,71$	$3,74 \pm 0,04$	$5,85 \pm 0,89$

**Figura 31:** Perfil de liberação *in vitro* para os sistemas líquido-cristalinos de FL, FC e FH contendo Triclosan<sup>®</sup> em diferentes concentrações em tampão fosfato isotônico pH 7,4 com adição de 2,0% (v/v) de Tween 20.



Foi observado também, que a FH promove uma liberação mais lenta do fármaco (Figura 31), e isso é relatado por outros autores na literatura (CABOI et al., 2001; SALLAM et al., 2002). A explicação para este comportamento é o fato de o caminho de difusão ser mais obstruído para a FH, comparado com a FC e FL. Os canais de água mais fechados da FH retarda a difusão do fármaco dissolvido através do sistema (SALLAM et al., 2002). Por outro lado, devido às

suas propriedades lipofílicas, o Triclosan<sup>®</sup> pode ficar aprisionado nas bicamadas lipídicas da FH, o que contribuiu para uma liberação mais lenta do fármaco por esta fase.

A FL, por sua vez, dá origem a uma liberação mais rápida que a FC e a FH, no entanto, foi observado que esta liberou o Triclosan<sup>®</sup> mais lentamente que a FC. Este resultado pode ser devido à transição de fase que ocorre já nos primeiros minutos de liberação, além do menor teor inicial de água e menor tamanho dos canais de água, o que dificultou a difusão e solubilização do fármaco. É relatado por outros autores que alterações na mesofase formada e, portanto, na dimensão dos canais aquosos, tem um impacto na difusividade da molécula através do sistema, alterando a velocidade de liberação (COSTA-BALOGH et al., 2010).

Com relação á concentração do fármaco, percebe-se que à medida que aumentou a concentração, diminuiu a velocidade de liberação e este resultado está de acordo com os dados do intumescimento. Com o aumento da concentração, o intumescimento diminui, diminuindo, também, a quantidade de água no sistema e o tamanho dos poros, prejudicando a solubilização e difusão do fármaco, como discutido anteriormente. Resultado semelhante foi encontrado por Kumar et al. (2004) ao avaliar o efeito da concentração do diazepan no intumescimento e perfil de liberação de sistemas formados por MO.

#### 4.5.4. Mecanismo de liberação dos sistemas líquido-cristalinos

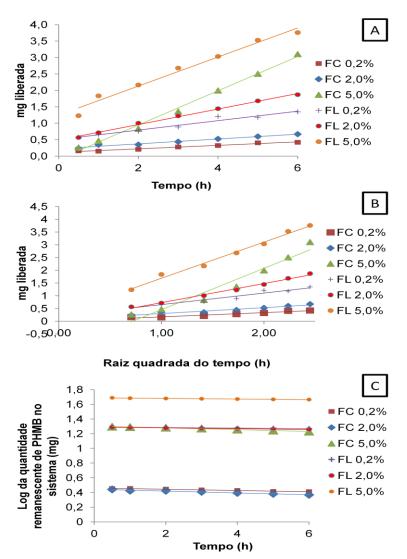
#### 4.5.4.1. Mecanismo de liberação dos sistemas contendo PHMB

Os dados de liberação obtidos foram analisados para descrever o mecanismo de liberação. A quantidade de PHMB liberada foi linear em função da raiz quadrada do tempo, indicando liberação controlada pela difusão, Tabela XXI e Figura 32 (HIGUCHI, 1962).

**Tabela XXI:** Coeficientes de correlação linear (R²) segundo vários modelos para a liberação de PHMB à partir dos sistemas líquido-cristalinos.

Formulações	R² 1ª ordem	R² Modelo de Higuchi	R² Ordem zero
Sistemas MO com 10% de água			
0,2% de PHMB	0,668	0,723	0,664
2,0% de PHMB	0,996	0,991	0,995
5,0% de PHMB	0,979	0,989	0,977
Sistemas MO com 30% de água			
0,2% de PHMB	0,941	0,934	0,938
2,0% de PHMB	0,998	0,977	0,998
5,0% de PHMB	0,979	0,999	0,078

**Figura 32:** Cinética de liberação para FL e FC contendo diferentes concentrações de PHMB segundo A) Cinética de Ordem Zero; B) Modelo de Higuchi e C) Cinética de 1ª Ordem.

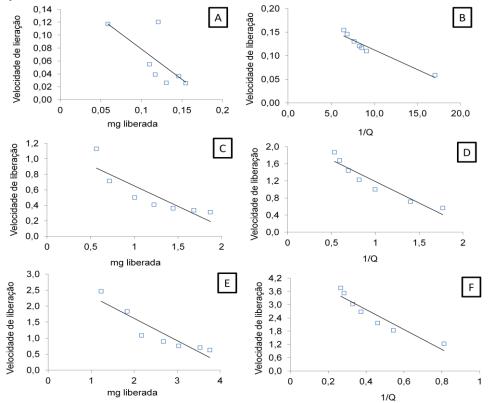


Para diferenciar o modelo de difusão do modelo de primeira ordem, o método proposto por Schwartz et al. (1968) foi usado e também indicou liberação controlada por difusão, conforme indicado na Tabela XXI e Figuras 33 e 34.

**Tabela XXII:** Coeficientes de correlação linear (R²) segundo Schwarts (1968) para a liberação de PHMB à partir de sistema líquido-cristalino.

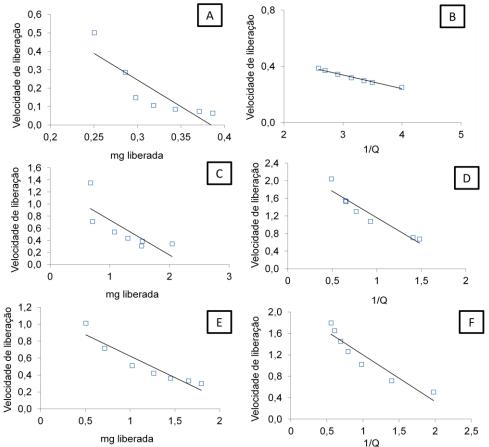
Formulações	R² Modelo de Higuchi	R² 1ª Ordem
Sistemas MO com 10% de água		
0,2% de PHMB	0,925	0,503
2,0% de PHMB	0,900	0,757
5,0% de PHMB	0,893	0,946
Sistemas MO com 30% de água		
0,2% de PHMB	0,892	0,757
2,0% de PHMB	0,907	0,604
5,0% de PHMB	0,889	0,886

**Figura 33:** Avaliação da cinética de liberação para FL contendo PHMB na concentração de 0,2% (A e B), 2,0% (C e D) e 5,0% (E e F) segundo modelo proposto por SCHWARTZ (1968) para Cinética de Primeira Ordem\* e Modelo de Higuchi\*\*.



<sup>\*</sup> Linearidade da velocidade de liberação *versus* quantidade do fármaco liberada; \*\* Linearidade da velocidade de liberação *versus* o inverso da quantidade de fármaco liberada (1/Q).

**Figura 34:** Avaliação da cinética de liberação para FC contendo PHMB na concentração de 0,2% (A e B), 2,0% (C e D) e 5,0% (E e F) segundo modelo proposto por SCHWARTZ (1968) para Cinética de Primeira Ordem\* e Modelo de Higuchi\*\*.



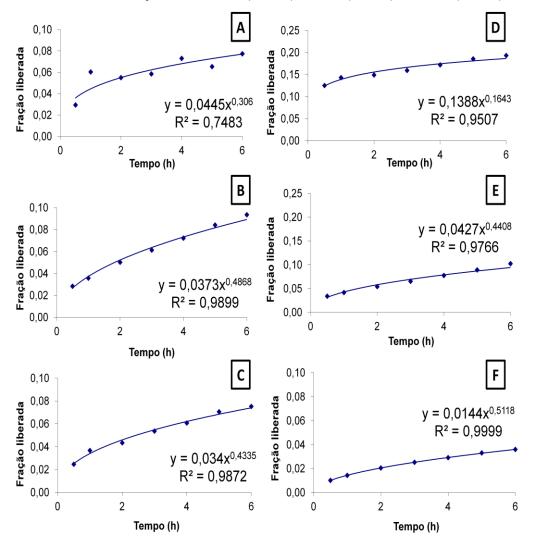
<sup>\*</sup> Linearidade da velocidade de liberação *versus* quantidade do fármaco liberada; \*\* Linearidade da velocidade de liberação *versus* o inverso da quantidade de fármaco liberada (1/Q).

Para caracterizar a influência do intumescimento na liberação do PHMB, uma equação exponencial (Equação 5) proposta por Rigter e Peppas (1987) foi empregada. De acordo com este modelo valores de n menores que 0,5 indicam liberação controlada por difusão de Fick; n entre 0,5 e 1,0 indica transporte anômalo (não Fickiano), onde a difusão do fármaco é influenciada por processos como o intumescimento ou a erosão do sistema. E valores de n maiores que 1, indicam transporte de caso II, onde a relaxação das cadeias que ocorre durante intumescimento do sistema é que controlam a liberação do fármaco. Os valores de n encontrados no presente estudo são mostrados na Tabela XXII e na Figura 35.

**Tabela XXIII:** Expoente difusional (RIGTER & PEPAS, 1987) para o perfil de liberação dos sistemas de MO/água contendo PHMB em diferentes concentrações.

Formulações	Expoente difusional, n
FL com 10% de água	
0,2% de PHMB	0,306
2,0% de PHMB	0,486
5,0% de PHMB	0,433
FC com 30% de água	
0,2% de PHMB	0,164
2,0% de PHMB	0,440
5,0% de PHMB	0,511

**Figura 35:** Determinação do expoente difusional (RIGTER & PEPAS, 1987) para o perfil de liberação dos sistemas de FL (1ª coluna) e FC (2ª coluna) contendo PHMB nas concentrações de 0,2% (A e D), 2,0% (B e E) e 5,0% (C e F).



Estes resultados mostram que a presença do PHMB nas concentrações avaliadas de 0,2 e 2,0% não influenciou a fração de fármaco liberado ou a cinética de liberação, que pode ser satisfatoriamente descrita pelo modelo controlado por difusão. Isto propõe que a taxa de liberação é controlada pela difusão das moléculas através do sistema e que ela diminui com o tempo, devido ao aumento da distância que o fármaco deve difundir através do sistema até alcançar o meio exterior que ocorre com o tempo, retardando sua liberação. Com exceção do sistema de FC à 5,0% (p/p) de PHMB que apresentou um modelo de transporte anômalo, indicando que tanto o intumescimento quanto a difusão influenciaram na taxa de liberação do fármaco pelo sistema.

## 4.5.4.2. Mecanismo de liberação dos sistemas contendo Triclosan®

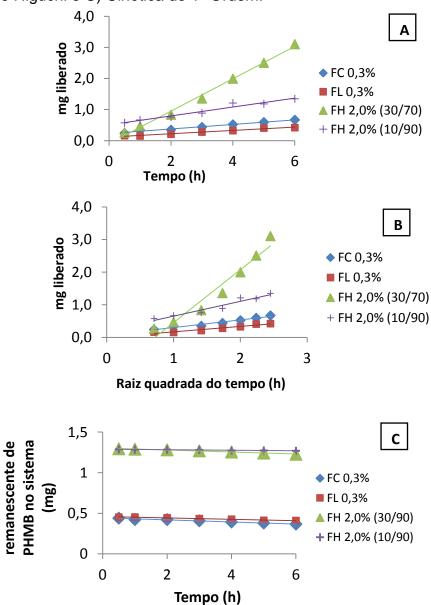
Os dados de liberação obtidos foram analisados para descrever o mecanismo de liberação. Para os sistemas de FC e FL, na concentração de 0,3% de Triclosan®, foi obtida linearidade do log da quantidade remanescente de Triclosan® no sistema em função do tempo (Tabela XXIII e Figura 36), indicando cinética de 1ª ordem, ou seja, a concentração do fármaco está influenciando no perfil de liberação. Isto ocorre quando a concentração do fármaco é inferior à sua concentração de saturação, desta forma, durante a liberação, a concentração do fármaco vai diminuindo. Já para os sistemas de FH, contendo 2,0% de Triclosan®, a quantidade do fármaco liberada foi linear em função do tempo, indicando cinética de Ordem Zero (Tabela XXIII e Figura 36). Isto significa que o fármaco já alcançou sua concentração de saturação no sistema, ou seja, sua concentração no sistema é maior que sua solubilidade. Logo, o fármaco liberado é substituído pela dissolução parcial do fármaco não solubilizado, resultando em uma concentração constante do fármaco (solução saturada).

Log da quantidade

**Tabela XXIV:** Coeficientes de correlação linear (R²) segundo vários modelos para os sistemas líquido-cristalinos contendo Triclosan® em diferentes concentrações.

Formulações	R² 1ª ordem	R <sup>2</sup> Modelo de Higuchi	<i>R</i> ² Ordem zero
Sistemas MO com 10% de água			_
0,3% de Triclosan <sup>®</sup>	0,987	0,952	0,986
2,0% de Triclosan <sup>®</sup>	0,957	0,938	0,957
Sistemas MO com 30% de água			
0,3% de Triclosan <sup>®</sup>	0,978	0,954	0,976
2,0% de Triclosan®	0,990	0,949	0,993

**Figura 36:** Cinética de liberação para sistemas líquido-cristalinos contendo Triclosan<sup>®</sup> em diferentes concentrações segundo A) Cinética de Ordem Zero; B) Modelo de Higuchi e C) Cinética de 1ª Ordem.



Estes resultados sugerem que a presença do fármaco alterou a cinética de liberação dos sistemas líquido-cristalinos, que, normalmente, são caracterizados pelo modelo de Higuchi. Isto pode ser explicado pela natureza hidrofóbica do fármaco e sua baixa solubilidade no sistema.

## 4.6. Avaliação ex vivo da mucoadesão em mucosa bucal

### 4.6.1. Avaliação ex vivo do tempo de permanência em mucosa bucal

O tempo de permanência da FL e FC em mucosa bucal foi avaliado *ex vivo* para observar o comportamento do sistema quando em contato com a superfície da mucosa e com a saliva, e para identificar uma formulação capaz de evitar inúmeras aplicações diárias.

A FC não se aderiu à mucosa, descolando rapidamente sob agitação, além de ser de difícil aplicação por ser altamente pegajosa e de alta viscosidade. Já a FL quando aplicada à mucosa bucal se aderiu rapidamente à mesma e mostrou alto tempo de permanência na mucosa. O experimento foi interrompido após 6 horas de agitação e o sistema ainda não havia se descolado da membrana. Foi observado ainda, que a FL havia se convertido em FC por microscopia de luz polarizada no final do experimento.

O resultado encontrado neste estudo mostra que a FL tem maior tempo de permanência que a FC, e que age como um precursor para a FC, que, por sua vez, é capaz de manter a mucoadesão quando formada *in situ*. Os mesmos resultados foram encontrados por Nielsen et al. (1998), que estudaram a mucoadesão de sistemas de MO e água e observaram que todas as amostras de FL converteram para FC ao final do experimento.

Uma possível explicação para os resultados obtidos com este sistema é que os precursores que captam água da mucosa durante conversão para a FC e a desidratação da mucosa esta envolvida no mecanismo de mucoadesão. Além disso, o mecanismo de mucoadesão da MO é considerado como sendo dependente da captação de água. Desta forma, o grau de mucoadesão aumenta com a habilidade do precursor para absorver água da mucosa, portanto a FL parcialmente hidratada mostra maior propriedade mucoadesiva que a FC

completamente hidratada (NIELSEN et al., 1998; DASH et al., 1999). O processo de captação de água pelo sistema líquido-cristalino em contato com a membrana é fundamental para as propriedades mucoadesivas do sistema e a transição de fases decorrente desta hidratação leva á formação da FC, capaz de controlar a liberação do fármaco.

## 4.6.2. Avaliação ex vivo da força de mucoadesão

A determinação da força de destacamento *ex vivo* em mucosa de bochecha de porco foi realizada para a MO, a FC e a FL (com diferentes teores iniciais de água), bem como a FL (10/90) e a FC (40/60) contendo 2,0 e 5,0% (p/p) de PHMB e 5,0% (p/p) de Triclosan<sup>®</sup>. Os valores das forças de destacamento permitem avaliar a influência do fármaco e do teor inicial de água no comportamento do sistema. Não foi avaliada a influência do CCP na força de destacamento uma vez que este não apresentou resultados favoráveis no ensaio de liberação e de atividade antimicrobiana. E foi escolhida a concentração de 5,0% do Triclosan<sup>®</sup> por este ter apresentado maior influência nos resultados de intumescimento.

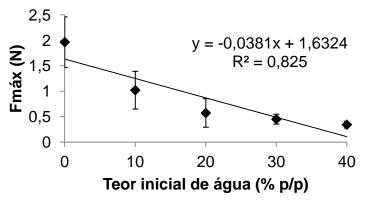
A Tabela XXV mostra os valores da força máxima de destacamento ( $F_{máx}$ ) da mucosa de bochecha de porco para os sistemas líquido-cristalinos estudados, bem como o trabalho de adesão ( $T_{adesão}$ ) realizado por cm². Foi observado que a  $F_{máx}$  e o  $T_{adesão}$  dependem do teor inicial de água, sendo que quanto menor o teor inicial de água, maior o valor dessas grandezas. Além disso, foi observado que a presença dos fármacos no sistema também pode influenciar a  $F_{máx}$  e, consequentemente, o  $T_{adesão}$  dependendo de suas propriedades físico-químicas.

**Tabela XXV:** Média da força máxima de destacamento  $(F_{máx})$  e trabalho de adesão  $(T_{adesão})$  para os sistemas líquido-cristalinos de FC e FL com e sem a presença do PHMB e FH contendo Triclosan<sup>®</sup>.

Amostra	F <sub>máx</sub> (N)	T <sub>adesão</sub> (mJ.cm⁻²)
Monoleína	1,96 ± 0,50	0,1209 ± 1,22
FL (10/90)	$1.02 \pm 0.37$	$0,0264 \pm 0,11$
FC (20/80)	$0.57 \pm 0.28$	$0,0252 \pm 0,07$
FC (30/70)	$0.45 \pm 0.10$	$0,0105 \pm 0,06$
FC (40/60)	$0.34 \pm 0.07$	$0,0089 \pm 0,04$
FL (10/90) + 2,0% PHMB	$1.39 \pm 0.10$	$0,0290 \pm 0,17$
FC (40/60) + 2,0% PHMB	$0.53 \pm 0.12$	$0,0123 \pm 0,02$
FL (10/90) + 5,0% PHMB	$1,79 \pm 0,39$	$0,0631 \pm 0,17$
FC (30/60) + 5,0% PHMB	$0.62 \pm 0.11$	$0,0297 \pm 0,24$
FH (10/90) + 5,0% Triclosan®	$0.99 \pm 0.04$	$0,0187 \pm 0,03$
FH (30/60) + 5,0% Triclosan®	$0,43 \pm 0,16$	$0,0055 \pm 0,07$

O gráfico da  $F_{m\acute{a}x}$  em função do teor inicial de água dos sistemas líquido-cristalinos de MO/água demonstra uma relação inversa com  $R^2=0.825$  entre o intervalo de 0 à 40% (p/p) no teor inicial de água (Figura 37). Tais resultados estão próximos aos resultados publicados por Lee et al. (2001), onde eles avaliaram a força de mucoadesão para sistemas líquido-cristalinos de MO contendo 16, 20, 26 e 30% (p/p) de água usando mucosa de bochecha de porco e encontraram um  $R^2=0.93$ . O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) indica a proporcionalidade entre as grandezas, sendo que quanto mais linear, ou seja, quanto mais próximo de 1, maior a proporcionalidade.

**Figura 37:** Relação entre a média da força máxima de destacamento (N) ± desvio padrão e o conteúdo inicial de água dos sistemas líquido-cristalinos de MO/água determinadas em mucosa de bochecha de porco (n=5).



Este resultado pode ser explicado uma vez que a mucoadesão de sistemas líquido-cristalinos de MO é devido à captação de água pelo sistema, como discutido no item anterior (DASH et al., 1999). Ao entrar em contato com a superfície úmida da mucosa, o sistema capta água do meio e intumesce, até que um equilíbrio seja alcançado, e o movimento de água do muco para o sistema conduz á consolidação da força mucoadesiva (SMART, 2005). Consequentemente, a FC (40/60) apresentou menor F<sub>máx</sub> uma vez que já atingiu a capacidade máxima de intumescimento, e está completamente hidratada, ao contrário da MO pura, cujo teor inicial de água é zero (LARA et al, 2005). O mesmo resultado foi encontrado por vários trabalhos relatados na literatura (DASH et al., 1999; LEE et al., 2001; NIELSEN et al., 1998; SHAH & PARADKAR, 2007; ENGSTROM et al., 1995). Tal resultado confirma o observado no item anterior, onde a FL (10/90) apresentou maior tempo de permanência que a FC (30/70) quando colocadas em contato com a mucosa de bochecha de porco. Além disso, também foi observado que no final do experimento todas as amostras apresentavam-se com características de FC, comprovando a transição de fases devido ao intumescimento dos sistemas.

Nielsen et al (1998) mediram o trabalho de adesão (mJ.cm<sup>-2</sup>) usando mucosa intestinal de porco com uma força de contato de 0,2N e 30 min de contato e encontraram maior propriedade de mucoadesão para monoglicerídeos não hidratados, seguido pela FL parcialmente hidratada e FC completamente hidratada. Ainda, compararam o trabalho de adesão dos sistemas líquidocristalinos com o de polímeros descritos na literatura por terem de excelente à fraca mucoadesão. Os resultados mostraram que a FC apresentou trabalho de adesão similar à dextrana e ao alginato de sódio (fraca mucoadesão), enquanto a FL teve um resultado próximo do HPMC e carbopol (boa à moderada mucoadesão) e a MO pura teve um resultado similar ao policarbofil (excelente mucoadesão) (NIELSEN et al., 1998).

Avaliando a interferência dos fármacos, PHMB e Triclosan<sup>®</sup>, na força de destacamento e no trabalho de adesão dos sistemas avaliados foi observado que a presença do PHMB aumentou a  $F_{máx}$  e o  $T_{adesão}$  da FC e da FL comparada com os mesmos sistemas sem adição do fármaco (Tabela XXV). Ao contrário, foi observado que a presença do Triclosan<sup>®</sup> na concentração de 5,0% (p/p) diminuiu

a  $F_{m\acute{a}x}$  e o  $T_{ades\~ao}$  comparada com os mesmos sistemas sem adição do fármaco (Tabela XXV). Estes resultados estão condizentes com os estudos de intumescimento, onde foi verificado que na concentração de 5,0% o PHMB aumentou fortemente a capacidade de intumescimento do sistema, enquanto o Triclosan® diminuiu o intumescimento. Consequentemente, uma vez que a propriedade mucoadesiva de sistemas líquido-cristalinos é dependente da sua capacidade de intumescer, justifica-se o aumento da força de destacamento pela presença do PHMB (SHAH & PARADKAR, 2007). Além disso, destaca-se o fato de que na concentração de 5,0% de Triclosan®, a FL e a FC não se formaram, ao invés disso foi obtida a FH. Shah & Paradkar (2007) avaliaram o efeito da presença de diferentes aditivos na força de mucoadesão da MO e verificaram que quando a presença do aditivo aumentava a capacidade de intumescimento, a  $F_{m\acute{a}x}$  também aumentava.

No entanto, existem estudos que indicam que a presença do fármaco em grande quantidade na superfície da FC resultante possa impedir a interação do sistema com a membrana mucosa (SALLAM et al., 2002). Sallam et al. (2002) verificaram uma redução nas propriedades adesivas de sistemas líquidocristalinos de FC adicionados de furosemida quando testadas em mucosa de estômago de coelho em pH 3,0. Neste ensaio foi avaliado o tempo para descolamento da amostra da superfície da mucosa em orientação vertical sob um fluxo crescente e conhecido do fluido gástrico simulado com enzimas. Em um estudo similar, Nielsen et al (1998) avaliaram a quantidade remanescente de MO usando mucosa do intestino de coelho após fluxo constante de tampão fosfato isotônico pH 0,02M por 30 min, como uma medida indireta das propriedades mucoadesivas do sistema. Foi avaliada a influência de vários fármacos com diferentes propriedades físico-químicas na mucoadesão de uma solução de MO/etanol. Para todos os fármacos estudados, observou-se que a propriedade mucoadesiva é dependente da concentração e que esta diminuiu à medida que a concentração era aumentada (NIELSEN et al. 1998).

5. CONCLUSÕES

Através das análises realizadas com os sistemas líquido-cristalinos, pode-se concluir que:

- É possível obter os sistemas líquido-cristalinos de fases lamelar e cúbica após adição de CCP (0,05%, 2,5% e 5,0%); PHMB (0,2%, 2,0% e 5,0%) e Triclosan<sup>®</sup> (0,3%) e a presença dos mesmos não prejudicou o intumescimento dos sistemas. No entanto, em concentrações superiores a 2,0% de Triclosan<sup>®</sup> foi obtida a fase hexagonal e na concentração de 5,0% o PHMB e o CCP alteraram o comportamento de fases do sistema.
- A cinética do intumescimento de todas as amostras com conteúdo inicial de água de 10% e 30% (p/p), com e sem adição dos fármacos, foram identificadas como seguindo um modelo de segunda ordem, em ambas as metodologias avaliadas. Foi observado que para fármacos hidrofílicos, como o PHMB, o aumento na concentração aumentou o intumescimento, enquanto que para fármacos hidrofóbicos, como o Triclosan<sup>®</sup>, o intumescimento dos sistemas diminuiu.
- A liberação incompleta do CCP dos sistemas formados por MO/água foi devido à ligação das moléculas do fármaco à mesofase de monoglicerídeos, o que justifica sua falta de atividade antibacteriana in vitro.
- A cinética de liberação do PHMB foi caracterizada pelo modelo de Higuchi e este padrão de liberação pode oferecer várias vantagens no tratamento de infecções microbianas, como liberação lenta e contínua do PHMB por um período prolongado. Além disso, o uso dos sistemas estudados permite a liberação do PHMB em locais específicos para as áreas mais susceptíveis para acumulação do biofilme, independente da adesão do paciente. Para o Triclosan<sup>®</sup>, foi demonstrado que a concentração do fármaco no sistema influencia fortemente sua cinética de liberação, devido às características hidrofóbicas do fármaco, no entanto, sem prejudicar sua aplicação bucal.
- Os resultados microbiológicos sugerem um sinergismo entre o PHMB e a
   MO. Apesar de não ter sido observado mesmo sinergismo com a adição

- do Triclosan<sup>®</sup>, foi obtida boa atividade antibacteriana para o sistema contendo este fármaco.
- O tempo de permanência in vitro da FL e FC demonstrou que a FL possui maior tempo de permanência que a FC, que apresentou grande dificuldade de aplicação, além de curto tempo de permanência na mucosa nas condições testadas. Estes resultados sugerem que a FL deve ser utilizada como uma fase precursora, e que alta viscosidade da FC formada in situ, através da captação de água pela FL, mantêm a mucoadesão do sistema. Este comportamento foi confirmado no ensaio da força de mucoadesão, onde foi observado que quanto menor o teor inicial de água no sistema, maior a força de destacamento do sistema na mucosa de bochecha de porco.
- Não foi avaliada a influência do CCP na força de destacamento uma vez que este não apresentou resultados favoráveis no ensaio de liberação e de atividade antimicrobiana.

Tendo como base os resultados apresentados, conclui-se que os sistemas líquido-cristalinos desenvolvidos com adição dos antimicrobianos bucais, PHMB e Triclosan<sup>®</sup>, nas concentrações de 2,0% (p/p), são interessantes candidatos com potencial para uso na prevenção e tratamento de infecções bucais. Uma vez que apresentaram um perfil de liberação *in vitro* favorável e demonstraram tempo de permanência na mucosa de bochecha de porco superior à 6 horas. No entanto, o CCP não apresentou resultados favoráveis para sua veiculação neste sistema.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>2</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR6023:2011.

- AL-MUSALLAM, T. A.; EVANS, C. A.; DRUMMOND, J. L.; MATASA, C.; WU, C. D.. Antimicrobial properties of an orthodontic adhesive combined with cetylpyridinium chloride. *Amer. Jour. Orthod. Dent. Orthop.*, v. 129, n. 2, p. 245-251, 2006.
- ALI, J.; KHAR, R.; AHUJA, A., KALRA, R.. Buccoadhesive erodible disk for treatment of oro-dental infections: design and characterization. *Int. J. Pharm.*. v. 283, p. 93–103, 2002.
- ALVES, D.; COSTA, A.L.; ALMEIDA, R. F.; CARVALHO, J. F. C.; FELINO, A.. Cloreto de cetilpiridínio revisão da literatura. Rev. Port. Estomatol. *Med. Dent. Cir. Maxilofac.*, 2011. doi:10.1016/j.rpemd.2011.11.006
- ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S.. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 71, p. 505–518, 2009.
- AMAR-YULI, I.; ASERIN, A.; GARTI, N.. Solubilization of nutraceuticals into reverse hexagonal mesophases. *J. Phys. Chem. B.*, v. 112, p. 10171-10180, 2008.
- AMAR-YULI, I.; WACHTEL, E.; SHOSHAN, E. B.; DANINO, D.; ASERIN, A.; GARTI, N.. Hexosome and hexagonal phases mediated by hidration and polymeric stabilizer. *Langmuir*, v. 23, p. 3637-3645, 2007.
- ANIBAL, P. C.. Potencial de ação antimicrobiana in vitro de extratos de plantas na inibição de *Candida spp, Streptococcus mutans e Staphylococcus aureus*. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo. 2007.
- ATKINS, P. W. Diffractions techiniques. In.: ATKINS, P. W. Physical Chemistry. *Oxford University Press.*, p. 619-646, 1998.
- BENDER, J; JARVOLL, P.; NYDÉN, M.; ENGSTROM, S. Structure and dynamics of a sponge phase in the methyl σ-aminolevulinate/monoolein/water/propylene glycol systems. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 317, p. 577-584, 2008.
- BERTRAM, U.; BODMEIER, R.. In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: In vitro characterization of a new nasal dosage form. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 27, p. 62–71, 2006.

BRAGG, W.L.. The diffraction of short electromagnetic waves by a crystal. *Proc. Camb. Philos. Soc.*, v. 17, p. 43–57, 1913.

BRUSCHI, M.L.; FREITAS, O. Oral bioadhesive drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.31, p.293-310, 2005.

BRUSCHI, M.L.. Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal. [Tese] Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP; 2006.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D.S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M.P.D.; FREITAS, O.; LARA, E.H.G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. *J. Pharm. Sci.*, v. 96, p. 2074–2089, 2007.

BRUSCHI, M.L.; FREITAS, O.; LARA, E.H.G.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M.P.D.; JONES, D.S.. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: development and characterization. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 34, p.267–78, 2008.

BLUCHER, A. G. V.. Dispositivos de liberação lenta de clorexidina para prevenção de periimpllantiite. 2007. 61 f. Dissertação (Mestrado). Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2007.

BURROWS, R.; COLLETT, J.H., ATTWOOD, D. The release of drugs from monoglyceride-water liquid crystalline phases. *Int. J. Pharm.*, v.111, p.283-293, 1994.

CARVALHO, F. C.. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina. 143f. Dissertação (Mestrado em Medicamentos-Cosméticos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraguara, São Paulo: 2009.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D.. Mucoadhsesive drug delivery systems. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 46, n. 1, 2010.

CABOI, F.; AMICO, G.S.; PITZALIS, P.; MONDUZZI, M.; NYLANDER, T.; LARSSON, K.. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein/water system. I. Phase behaviour. **Chem. Phys. Lipids.**, v. 109, p. 47–62, 2001.

CARR, M. G.; CORISH, J.; CORRIGAN, O. I.. Drug delivery from a liquid crystalline base across Visking and human stratum corneum. *Int. J. Pharm.*, v.157, p. 35–42, 1997.

CHANG, C.M.. Application of monoglyceride-based materials as sustained release drug carriers. Dissertation (Pós-doutorado). Universidade do Texas, Austin, 1995.

CHANG C.M.; BODMEIER, R. Effect of dissolution media and additives on the drug release from cubic phase delivery systems. *J. Controlled Release*, v.46, p. 215-222, 1997a.

CHANG, C. M.; BODMEIER, R.. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.*, v. 86, p. 747–752, 1997b.

CHANG C.M.; BODMEIER, R.. Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase. *Int. J. Pharm.* v. 173, p. 51–60, 1998.

CHIAPPETTA, D.; DEGROSSI, J.; TEVES, S.; D'ALQUINO, M.; BREGNI, C.; SOSNIK, A.. Triclosan-loaded poloxamine micelles for enhanced topical antibacterial activity against biofilm. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 69, p. 535-545, 2008.

CLOGSTON, J.; RATHMAN, J, THOMASKO, D.; WALKER, H., CAFFREY, M. Phase behaviour of a monoacylglycerol (Myverol 18-99K)/water systems. *Chem. Phys. Lipids*, v.107, p.191-220, 2000.

COSTA-BALOGH, F. O. C.; SPARR, E.; SOUZA, J. J. S.; PAES, A. C.. Drug release from lipid liquid crystalline phases: relation with phase behavior. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 36, n. 4, p. 470–481, 2010.

CZESLIK, C.; WINTER, R.; RAPP, G.; BARTELS, K. Temperature and pressure dependent phase behaviour of monoacylglycerides monoolein and monooelaidin. **Biophys. J.**, v.68, p.1423-1429, 1995.

DASH, A. K.; GONG, Z.; MILLER, D. W.; HUAI-YAN, H.; LAFORET, J. P.. Development of a rectal nicotine delivery system for the treatment of ulcerative colitis. *Int. J. Pharm.*, v. 190, p. 21-34, 1999.

DONG, Y.; BOYD, B. J.. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. *Int. J. Pharm.*, v. 417, p. 101-111, 2011.

DRUMMOND, C. J.; FONG, C.. Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery Vehicles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, v. 4, p. 449-456, 2000.

ENGELBRECHT, T. N.; SCHROETER, A.; HAUB, T.; NEUBERT, R. H. H.. Lipophilic penetration enhancers and their impact to the bilayer structure of stratum corneum lipid model membranes: Neutron diffraction studies based on the example Oleic Acid. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1808, p. 2798–2806, 2011.

ENGSTROM, S.. Drug delivery from cubic and other lipid-water phases. *Lipid Technol*. v. 2, p. 42–45, 1990.

ENGSTROM, S.; ENGSTROM, L.. Phase behavior of the lidocaine-monooleinwater system. *Int. J. Pharm.*, v. 79, p. 113–122, 1992.

ENGSTROM, S.; LANDH, T.; LJUNGER, G.. The effect of lidocaine on the phase behaviour of the monoolein/water system. *Proc. 5th Int. Conf. Pharm. Technol.*. pg. 432-438, 1989.

ENGSTROM, S.; LARSSON, K.; LINDMAN, B.. Liquid crystalline phases as delivery systems for drugs: I. Basic principles. *Controlled Release Bioac. Mater.* v. 105, 1988.

ENGSTROM, S.; LJUSBERG-WAHREN, H.; GUSTAFSSON, A.. Bioadhesive properties of the monoolein water system. *Pharm. Techn. Europe*, p. 14–17, 1995.

ESPOSITO, E.; CARTTA, V.; SCABBIA, A.; TROMBELLI, L.; D'ANTONA, P.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C.. Comparative analysis of tetracycline-containing dental gels: poloxamer- and monoglyceride-based formulations. *Int. J. Pharm.*, v. 142, p. 9-23, 1996.

EVANGELISTA, R. C. Sistemas de liberação controlada de fármacos. 345 f. Tese (Livre Docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, São Paulo: 2006.

FARKAS, E.; ZELKÓ, R.; NÉMETH, Z.; PÁLINKÁS, J.; MARTON, S.; RÁCZ, I. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. *Int. J. Pharm.*, v.193, p.239-245, 2000.

FARKAS, E.; ZELKÓ, R.; TÖROK, G.; RÁCZ, I.; MARTON, S. Influence of chlorhexidine species on the liquid crystalline structure of vehicle. *Int. J. Pharm.*, v.213, p.1-5, 2001.

FARKAS, E.; KISS, D.; ZELKÓ, R. Study on the release of chlorhexidine base and salts from different liquid crystalline structures. *Int. J. Pharm.*, v.340, p.71-75, 2007.

FENG, L.; WU, F.; LI,J.; JIANG, Y.; DUAN, X.. Antifungal activities of polyhexamethylene biguanide and polyhexamethylene guanide against the citrus sour rot pathogen Geotrichum citri-aurantii in vitro and in vivo. *Posth. Biol. Tech.*, v. 61, p. 160–164, 2011.

FEHER, A.; URBAN, E.; EROS, I.; SZABÓ-RÉVESZ, P.; CSÁNYI, E. Lyotropic liquid crustal preconcentrates for the treatment of periodontal disease. *Int. J. Pharm.*, v.358, p. 23-26, 2008.

FERES, M.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVARI, M.; STEWART, B.; VIZIO, W.. The effectiveness of a preprocedural mouthrinse containing cetylpyridinium chloride in reducing bacteria in the dental office. *JADA*, v. 142, n. 4, p. 415-422, 2010.

FONG, C.; LE, T.; DRUMMOND, C. J.. Lyotropic liquid crystal engineering—ordered nanostructured small molecule amphiphile self-assembly materials by design. *Chem. Soc. Rev.*, v. 41, p.1297–1322, 2012.

GAJDZIOK, J.; BAJEROVÁ, M.; CHALUPOVÁ, Z.; RABIŠKOVÁ, M.. Oxycellulose as mucoadhesive polymer in buccal tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 36, n. 9, p. 1115–1130, 2010.

GARDINER, J.; FREEMAN, S.; LEACH, M.; GREEN, A.; ALCOCK, J.; D'EMANUELE, A.. PAMAM dendrimers for the delivery of the antibacterial Triclosan. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, v. 23, n. 5, p. 623–628, 2008.

GERAGHTY, P. B.; ATTWOOD, D.; COLLETT, J. H.; DANDIKER, Y. The in vitro release of some muscarinic drugs from monoolein/water lyotropic crystalline gels. *Pharm. Res.*, v. 13, p. 1265-1271, 1996.

GIANNOLA, L. I.; DE CARO, V.; GIANDALIA, G.; SIRAGUSA, M. G.; TRIPODO, C.; FLORENA, A. M.; CAMPISI, G.. Release of naltrexone on buccal mucosa: Permeation studies, histological aspects and matrix system design. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 67, p. 425–433, 2007.

GROVE, D. C.; RANDALL, W.A. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual, New York: **Medical Encyclopedia Inc.**, p.80 (Antibiotics monographs, 02),1955.

GODDERIS, C.; GODERIS, B.; VAN DEN MOOTER, G.. Lyotropic, liquid crystalline nanostructures of aqueous dilutions of SMEDDS revealed by small-angle X-ray scattering: Impact on solubility and drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 40, p. 110–117, 2010.

GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R. J.; ZHAI, G.. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discov. Today*, v. 15, n. 23/24, p. 1032-1040, 2010.

HÄGERSTRÖM, H. Polymer gels as pharmaceutical dosage forms: rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery. n. 293, 76 p. Dissertação. Faculdade de Farmácia – Universidade de Uppsala, Uppsala, 2003.

HAMUD-SOCORO, A. A.. *Pseudomonas aeruginosa* resistance to tetracycline and triclosan. *Division of Science and Technology*, v. 12, p. 7-9, 2004.

HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINE, J. A.; BENTLEY, M. V. L. B.; LOPEZ, R. F. V. L.. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. *Int. J. Pharm.*, v. 329, p. 88–93, 2007.

HIGUCHI, W. I.. Analysis of data on the medicament release from ointments. *J. Pharm. Sci.*, v. 51, p. 802–804, 1962.

HOQ, I.; IBRAHIM, H. R.. Potent antimicrobial action of Triclosan-lysozyme complex against skin pathogens mediated through drug-targeted delivery mechanism. *Eur. J. Pharm. Sci*, v. 42, p. 130–137, 2011.

HU, D.; LI, X.; SREENIVASAN, K.; DEVIZIO, W.. A Randomized, Double-Blind Clinical Study to Assess the Antimicrobial Effects of a Cetylpyridinium Chloride Mouth Rinse on Dental Plaque Bacteria. *Clin. Therap.*, v. 31, n. 11, 2009.

HUBNER, N. O.; KRAMER, A.. Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. *Skin Pharmacol. Physiol.*, v. 23, n. 1, p. 17–27, 2010. DOI: 10.1159/000318264.

IBRAHIM, H.G. Release studies from lyotropic liquid crystal systems. *J. Pharm. Sci.*, v.78, p.683-687, 1989.

ISSA, J.P.M.; NASCIMENTO, C.; BENTLEY, M.V.L.B.; DELBELE, A.; IYOMASA, M.M.; SEBALD, W.; ALBUQUERQUE JR, R.F. Bone repair in rat mandible by rhBMP-2 associated with two carriers. *Micron*, v.39, p.373-379, 2008a.

ISSA, J.P.M.; SPADARO, A.C.C.; BENTLEY, M.V.L.B.; IYOMASA, M.M.; SIESSERE, S.; REGALO, S.C.H.; DEFINO, H.L.A. Monoolein and chitosan gels as potential carriers of the rHBMP-2 using decortications surgical technique in Wistar rat as experimental model. *Micron*, v.39, p. 952-959, 2008b.

JUG, M.; KOSALEC, I.; MAESTRELLI, F.; MURA, M.. Analysis of Triclosan inclusion complexes with β-cyclodextrin and its water-soluble polymeric derivative. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v. 54, p. 1030–1039, 2011.

KHUTORYANSKIY, V.V.. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromol. Biosci.*, v.11, p.748-764, 2011.

KUMAR, M.K.; SHAH, M.H.; KETKAR, A.; MAHADIK, K.R.; PARADKAR, A.. Effect of drug solubility and different excipients on floating behavior and release from glyceryl monooleate matrices. *Int. J. Pharm.*, v. 272, p. 151–160, 2004.

- KWON, T. K.; HONG, S. K.; KIM. J-C.. In vitro skin permeation of cubosomes containing triclosan. *J. Ind. Eng. Chem.*, v. 18, p. 563–567, 2012.
- LARA, M.G. Sistemas líquido-cristalinos de monoleína/água para liberação de fármacos: cinética de liberação e permeação cutânea *in vitro.* 144f. Tese (Doutorado em Fármaco-Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo: 2001.
- LARA, M. G.; BENTLEY, M. V. L.; COLLETT, J. H.. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. *Int. Jour. Pharm.*, ed. 293, pg. 241-250, 2005.
- LEE, J.; CHOI, S.; YOON, M. K.; CHOP, Y. W.. Kinetic Characterization of Swelling of Liquid Crystalline Phases of Glyceryl Monooleate. *Arch. Pharm. Res.*, v. 2, n. 10, p. 880-885, 2003.
- LEE, V. A.; KARTHIKEYAN, R.; RAWLS, H. R.; AMAECHI, B. T.. Anti-cariogenic effect of a cetylpyridinium chloridecontaining Nanoemulsion. *J. Dent.*, v. 38, p. 742–749, 2010.
- LEE, J.; KELLAWAY, I.W. In vitro peptide release from liquid crystalline buccal delivery systems. *Int. J. Pharm.*, v.195, p. 29-33, 2000a.
- LEE, J.; KELLAWAY, I.W. Buccal permeation of [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. *Int. J. Pharm.*, v.195, p. 35-38, 2000b.
- LEE, J.; KELLAWAY, I.W. Combined effect of oleic acid and polyethylene glycol on buccal permeation of [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin from a cubic phase of glyceryl monooleate. *Int. J. Pharm.*, v.204, p. 137-44, 2000c.
- LEE, J.; YOUNG, S.A.; KELLAWAY, I.W. Water quantitatively induces the mucoadhesion of liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.53, p.629-636, 2001.
- LIBSTER, D.; ASERIN, A.; WACHTEL, E.; SHOHAM, G.; GARTI, N. An HII liquid crystal-based delivery system for cyclosporine A: physical characterization. *J. Colloid Sci.*, v. 308, p. 514-524, 2007.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N.. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: Drug delivery and crystallization applications. *J. Colloid Sci.*, v. 356, p. 375–386, 2011.

MANO, D. M.. Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos com vitamina E TPGS para veiculação de de siRNA na terapia gênica. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MARSH, P.; MARTIN, M. V.. Microbiologia oral. Ed. Santos, São Paulo – SP, 4<sup>a</sup> ed., 2005.

MORALES, J.O.; McCONVILLE, J.T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.77, p.187-199, 2011.

MULLER-GOYMANN, C.C.; FRANK, S.G. Interaction of lidocaine and lidocaine HCl with the liquid crystal structure of topical preparation. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.29, p.147-159, 1986.

NAKAMOTO, R. Y.. Use of a saliva substitute in postradiation xerostomia. *J. Prost. Dent.*, v. 42, n. 5, 1979.

NASCIMENTO, A. P.; TANOMARU, J. M. G.; MATOBA-JÚNIOR, F.; WATANABE, E.; TANOMARU-FILHO, M.; ITO, I. Y.. Maximum inhibitory diluition of mouthwashes containing clorhexidine and polyhexamethylene biguanide against salivary Staphylococcus aureus. *J. Appl. Oral Sci.*, v.16, n. 5, p.336-339, 2008.

NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems. I. Chracterization of muco adhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl mono-linoleate. *Eur. J. Pharm. Sci*, v.6, p.231-39, 1998.

NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTR"ON, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S. S.. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 19, p. 687–692, 1992.

QIU, H.; CAFFREY, M. The phase diagram of monoolein/water systems: metastability and equilibrium aspects. *Biomaterials*, v.21, p. 223-234, 2000.

PATEL, R.; PATEL, N. T.. Liquid Crystals and Their Application in the Field of Drug Delivery. *Colloids in Drug Delivery*. Taylor & Francis Group, cap. 13, v. 150, pg. 311-336, 2010.

PHAN, S.; FONG, W. K.; KIRBY, N.; HANLEY, T.; BOYD, B. J.. Evalution the link between seif-assembled mesophase structure and drug release. *Int. J. Pharm.*, v. 421, p. 176-182, 2011.

PERIOLI, L.; AMBROGIA, V.; PAGANOA, C.; SCUOTA S. B.; ROSSI, C.. FG90 chitosan as a new polymer for metronidazole mucoadhesive tablets for vaginal administration. *Int. J. Pharm.*, v. 377, p. 120–127, 2009.

RATHKE, A.; STAUDE, R.; MUCHE, R.. Antibacterial activity of a triclosan-containing resin composite matrix against three common oral bacteria. *J. Mater. Sci.: Mater Med.*, v. 21, p. 2971-2977, 2010.

RIGTER, P.L.; PEPPAS, N.A.. Asimple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Controlled Release.*, v. 5, p. 37–42, 1987.

RIZWAN,S. B.; HANLEY, T.; BOYD, B.J.; RADES, T.; HOOK, S.. Liquid Crystalline Systems of Phytantriol and Glyceryl Monooleate Containing a Hydrophilic Protein:Characterisation, Swelling and Release Kinetics. *J. Pharm Sci.*, v. 98, n. 11, 2009.

ROSEVEAR, F.B. The microscopy of the liquid crystalline neat and middle phases of soaps and synthetic detergents. *J. Am. Chem. Soc.*, v.31, p.628-39, 1954.

ROSIN, M.; WELK, A.; BENHARDT, O.; RUHNAU, M.; PITTEN, F. A.; KOCHER, T.; KRAMER, A.. Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque. *J. Clin. Periodontol.*, v. 28, p. 1121-1126, 2001.

ROSIN, M.; WELK, A.; KOCHER, T.; MAJIC-TODT, A.; KRAMER, A.; PITTEN, F. A..The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth. *J. Clin. Periodontol.*, v. 98, p. 392-399, 2002.

SALLAM, A.; KHALIL, E.; IBRAHIM, H.; FREIJ, I.. Formulation of an oral dosage form utilizing the properties of cubic liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 53, p. 343-352, 2002.

SCHOTT, H. Kinetics of swelling of polymers and their gels. *J. Pharm. Sci*, v. 81, p. 467-470, 1992.

SCHWARTZ, J.B.; SIMONELLI, A.P.; HIGUCHI, W.I.. Drug release from wax matrices. I. Analysis of data with first-order kinetics and with the diffusion-controlled model. *J. Pharm. Sci.*, v. 57, p. 274–277, 1968.

SCRIVENER, C. A.; SCHANTZ, C. W.. Penicillin: new methods for its use in dentistry. *J. Am. Dental Assoc.*, v. 35 (9), p. 644-647, 1947.

SEDDON, J.M. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1031, p. 1-69, 1990.

SHAH, M. H.; PARADKAR, A.. Effect of HLB of additives on the properties and drug release from the glyceryl monooleate matrices. *Eur. Jor. Pham. Biopharm.*, v. 67, p. 166-174, 2007.

SHAH, J. C.; SADHALA, Y.; CHILUKURI, D. M.. Cubic phase as drug delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v. 47, p. 229-250, 2001.

SHARMA, S.; RAMYA, T. N. C.; SUROLIA, A.; SUROLIA, N.. Triclosan as a Systemic Antibacterial Agent in a Mouse Model of Acute Bacterial Challenge. **Antimicrob.** *Agents Chemother.*, v. 47, n. 12, p. 3859-3866, 2003

SIMONETTI, L.; GELFUSO, G. M.; BARBOSA, J. C. R.; LOPEZ, R. F. V.. Assessment of the percutaneous penetration of cisplatin: The effect of monoolein and the drug skin penetration pathway. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 73, p. 90–94, 2009.

SMART, J. D.. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v. 57, p. 1556–1568, 2005.

STEINBERG, D.;TAL, T.; FRIEDMAN, M.. Sustained-Release Delivery Systems of Triclosan for Treatment of Streptococcus mutans Biofilm. *J. Biomed. Ater. Res. B Appl. Biomater.*, v. 77 (2), p. 282-286, 2006. DOI: 10.1002/jbm.b.30266.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K.. Buccal bioadhesive drug delivery — A promising option for orally less efficient drugs. *J. Controlled Release*, v. 114, p. 15–40, 2006.

TATE, M.W.; EIKENBERRY, E.F.; TURNER, D.C.; SHYAMASUNDER, E.; GRUNER, S.M. Nonbilayer phases of membrane lipids. *Chem. Phys. Lipids*, v.57, p.147-164, 1991.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A. A.; RODRIGUES, J. R. Agentes antimicrobianos e seu potencial uso na Odontologia. *Rev. UNESP*, v.3, n.2, Jul/Dez. 2000.

TYLE, P. Liquid crystal and their application in drug delivery. In: Controlled release of drug: polymers and aggregate systems. *Morton Rosoff UHC Publishers*, New York, v.4, p.125-162, 1989.

UTYAMA, I. K. A.; WATANABE, E.; ANDRADE, D.; ITO, I. Y. Atividade antimicrobiana in vitro do ácido acético e dos vinagres branco e tinto sobre bactérias hospitalares. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, v. 5, n. 2, p. 111-116, 2006.

ZAMAN, M. A.; MARTIN, G. P.; REES, G. D.. Bioadhesion and retention of non-aqueous delivery systems in a dental hard tissue model. *J. Dent.*, v. 38, p. 757–764, 2010.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; BARREIRA, S. M. W.; NAKASHIMA, T.; CURY, C. D.; COSTA, C. K. Enxaguatório bucal: principais ativos e desenvolvimento de formula contendo extrato hidroalcoólico de Salvia Officinalis L. *Rev. Técnico Cientifica UFPR*, v.8, nº 1. 2007.

WELK, A.; SPLIETH, C. H.; SCHMIDT-MARTENS, G.; SCHWAHN, C. H.; KOCHER, T.; KRAMER, A.; ROSIN, M.. The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared with a Triclosan rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque re-growth. *J. Clin. Periodontol.*, v. 32, p. 499-505, 2005.